



**SKRIPSI – TK141581**

**PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA  
DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS  
MENGUNAKAN GAS PENEKAN N<sub>2</sub>**

**Oleh:**

**Yorgy Eka Pradipta**

**NRP.2311100081**

**Bergas Kristiadi**

**NRP.2311100090**

**Dosen Pembimbing :**

**Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng**

**NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2015**



**SKRIPSI – TK141581**

**PRODUCTION OF REDUCING SUGAR FROM  
COCONUT HUSK BY SUBCRITICAL WATER PROCESS  
PRETREATMENT WITH N<sub>2</sub> AS THE PRESSING GAS**

**By:**

**Yorgy Eka Pradipta**

**NRP.2311100081**

**Bergas Kristiadi**

**NRP.2311100090**

**Advisor :**

**Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng**

**NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTEMENT OF CHEMICAL ENGINEERING  
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY  
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
SURABAYA  
2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS MENGUNAKAN GAS PENEKAN $N_2$

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar  
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

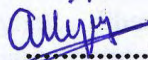
Oleh:

**Yorgy Eka Pradipta**  
**Bergas Kristiadi**

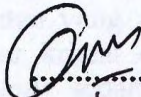
**2311 100 081**  
**2311 100 090**

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

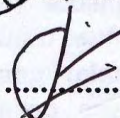
1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

  
.....(Pembimbing I)

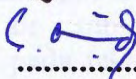
2. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

  
.....(Penguji I)

3. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

  
.....(Penguji II)

4. Dr. Ir. Kuswandi, DEA

  
.....(Penguji III)



**Surabaya,**  
**Juli 2015**

# **PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS MENGGUNAKAN GAS PENEKAN N<sub>2</sub>**

**Nama** :1. Yorgy Eka Pradipta (2311 100 081)  
2. Bergas Kristiadi (2311 100 090)  
**Jurusan** : Teknik Kimia  
**Dosen** : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

## **ABSTRAK**

Bahan lignoselulosa adalah material yang sangat potensial untuk dikembangkan untuk pembuatan gula reduksi kemudian difermentasi menjadi biofuel. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan *pretreatment* bahan lignoselulosa berlignin tinggi dari sabut kelapa dengan menggunakan metode air subkritis menggunakan gas N<sub>2</sub> sebagai penekan. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tekanan 20, 30, dan 40 bar dan suhu 110, 130, 150 dan 170°C. Produk yang dihasilkan dari *pretreatment* air subkritis yaitu larutan yang mengandung gula dan produk turunan dari lignin, dan padatan yang mengandung selulosa, hemiselulosa dan lignin. Struktur kristal dari substrat dianalisis dengan XRD (*X-Ray Diffraction*) sedangkan cairan dianalisis dengan metode analisa DNS (*dinitrosalicylic acid*). Kemudian, padatan debu sabut kelapa yang telah dilakukan *pretreatment* dihidrolisis dengan menggunakan enzim selulase murni. Setelah dilakukan *pretreatment* air subkritis, hasil konsentrasi liquid gula terbaik didapatkan pada tekanan 40 bar dengan suhu 170°C, dengan yield 11,83 gram gula reduksi / 100 gram sabut kelapa. Sedangkan hasil terbaik setelah hidrolisis enzimatik didapatkan pada hasil *pretreatment* dengan tekanan 40 bar dengan suhu 110°C dengan yield 21,36 gram gula reduksi / 100 gram sabut kelapa.

**Kata kunci:** air subkritis; gula; lignoselulosa; lignin; debu sabut kelapa

# **PRODUCTION OF REDUCING SUGAR FROM COCONUT HUSK BY SUBCRITICAL WATER PROCESS PRETREATMENT WITH N<sub>2</sub> AS THE PRESSING GAS**

**Name** : 1. Yorgy Eka Pradipta (2311 100 081)  
2. Bergas Kristiadi (2311 100 090)  
**Department** : Chemical Engineering  
**Advisor** : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

## **ABSTRACT**

Lignocellulosic materials a potential resource to be developed for the manufacture of reducing sugars and then fermented into biofuel. The purpose of this work was to manufacture of reducing sugar from lignocellulosic materials, coconut husk using subcritical water pressurized by N<sub>2</sub>. The experiment variables used were pressure 20, 30, dan 40 bar and temperature 110, 130, 150 and 170°C. Of subcritical water *pretreatment* were obtained two products, liquid containing sugar and solid, which was proceeded to enzymatic hydrolysis. The crystal structures of the substrate were analyzed by XRD and the obtained liquid was analyzed by DNS method. After subcritical water pretreatment, the highest liquid sugar concentration was obtained at a pressure of 40 bar at a temperature of 170°C, which yield 11,83 gr of reducing sugar/100 gr of coconut husk. Meanwhile, the amount of sugar released enzymatically from SCW-pretreated (40 bar and 110°C) substrate using pure cellulase was 21.36 gr of reducing sugar/100 gr of coconut husk, which was the biggest result.

**Key word:** lignin; lignocellulose; subcritical water; sugar; coconut coir dust

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yesus Kristus karena hanya oleh Kasih Karunia-Nya kami dapat menyelesaikan skripsi kami yang berjudul :

### **“PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS MENGGUNAKAN GAS PENEKAN N<sub>2</sub>”**

Skripsi ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan pada jenjang pendidikan S1 di Progam Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak lain yang membantu dalam penyelesaian laporan ini baik secara material dan nonmaterial, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Dosen Pembimbing dan Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia , atas bimbingan dan saran yang telah diberikan.
3. Bapak Setiyo Gunawan, ST., Ph.D, selaku Koordinator Tugas Akhir Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
4. Bapak dan Ibu Dosen pengajar serta seluruh karyawan Jurusan Teknik Kimia.
5. Teman-teman Lab Biokimia dan Teknik Kimia Angkatan 2011 untuk dukungan dan bantuan dalam penyusunan laporan ini.
6. Orang tua dan saudara-saudara kami atas doa, bimbingan, perhatian, dan kasih sayang yang selalu tercurah selama ini.

Kami menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan laporan ini, yang membutuhkan saran yang konstruktif demi penyempurnaannya. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak sepenuhnya sempurna sehingga diperlukan evaluasi untuk

peningkatan kualitas yang berkelanjutan. Penulis mengharapkan kritik dan masukan dari seluruh pembaca laporan ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi seluruh pihak yang membacanya.

Surabaya, 15 Juni 2015

Penyusun

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	ix
I. PENDAHULUAN	
I.1 Latar belakang	I-1
I.2 Perumusan masalah	I-6
I.3 Tujuan	I-6
I.4 Manfaat Program	I-7
II. TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Bahan lignoselulosa	II-1
II.2 Delignifikasi dan Pretreatment Lignoselulosa	II-3
II.3 Komposisi kimia lignoselulosa dalam sabut kelapa	II-5
II.4 Sub dan superkritik	II-6
II.5 Hidrolisis Enzimatik	II-17
II.6 Penelitian Terdahulu	II-20
III. METODE PENELITIAN	
III.1 Variabel Penelitian	III-1
III.2 Bahan dan Alat	III-1
III.3 Prosedur eksperimen	III-3
III.4 Prosedur Pengukuran	III-4
III.5 Hidrolisis Padatan	III-6
III.6 Diagram Alir Percobaan	III-11
III.7 Waktu dan Tempat Penelitian	III-12
IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Pretreatment Sabut Kelapa	IV-1
IV.2 Hidrolisis Sabut Kelapa	IV-11
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	V-1
V.2 Saran	V-1
DAFTAR PUSTAKA	A-1





## DAFTAR TABEL

Tabel I.1 Komposisi kimia bahan lignoselulosa	I-5
Tabel 2.3.1 Komponen kimiawi sabut kelapa	II-6
Tabel 2.4.1 Properti air pada berbagai kondisi	II-7
Tabel 2.4.2 Komponen sakarida dan inhibitor setelah 30 menit <i>subcritical water pretreatment</i>	II-16
Tabel IV.1 Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah <i>Pretreatment</i> dengan Reaktor Subkritis	IV-3
Tabel IV.2 Selulosa dan Hemiselulosa yang terkonversi menjadi gula reduksi setelah <i>pretreatment</i> dengan reaktor subkritis	IV-4
Tabel IV.3 Prosentase Komposisi Kimia Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah <i>Pretreatment</i> dengan Reaktor Subkritis	IV-6
Tabel IV.5 Hasil Massa Gula Reduksi dan Yield Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-7
Tabel IV.6 Perbandingan Perolehan Massa Gula Reduksi dan Yield dengan Perbedaan Perlakuan	IV-8
Tabel IV.8 Perhitungan Kurva Standar Glukosa(dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulas	IV-12
Tabel IV.9 Pengukuran aktivitas enzim selulase	IV-13
Tabel IV.10 Perhitungan Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Sabut Kelapa	IV-14
Tabel IV.11 Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan <i>Pretreatment</i> Air Subkritis untuk Variabel I (20 bar), II (30 bar), dan III (40 bar) (suhu 110°C)	IV-16
Tabel IV.12 Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan <i>Pretreatment</i> Air Subkritis untuk Variabel IV (20 bar), V (30 bar), dan VI (40 bar) (Suhu 130°C)	IV-19
Tabel IV.13 Hasil Hidrolisis Sabut kelapa dengan <i>Pretreatment</i> Air Subkritis untuk Variabel IV (20 bar), V (30 bar), dan VI (40 bar) (Suhu	IV-20

	150°C)	
Tabel IV.14	Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan <i>Pretreatment</i> Air Subkritis untuk Variabel IV (20 bar), V (30 bar), dan VI (40 bar) (Suhu 170°C)	IV-22
Tabel IV.15	Yield Gula Reduksi dari Liquid Hasil <i>Pretreatment</i> dengan Metode Air Subkritis	IV-26
Tabel IV.16	Tabel Analisa Gravimetri Sebelum dan Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-27
Tabel IV.17	Neraca Massa Lignin Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-28
Tabel IV.18	Neraca Massa Hemiselulosa Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-29
Tabel IV.19	Neraca Massa Selulosa Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-30
Tabel IV.20	Hasil Analisa DNS Total Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis	IV-31
Tabel IV.21	Hasil Analisa DNS Total Setelah <i>Pretreatment</i> Air Subkritis dan Hidrolisis Enzimatik	IV-32
Tabel IV.22	Yield Gula Reduksi dari Liquid Hasil <i>Pretreatment</i> dengan Metode Air Subkritis dan Hidrolisis Enzimatik	IV-33

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1 Struktur selulosa	II-1
Gambar 2.1.2 Struktur hemiselulosa	II-3
Gambar 2.2.1 Struktur lignin	II-5
Gambar. 2.4.1 Sifat fisik air (kerapatan, konstanta dielektrik, kapasitas panas, dan viskositas) terhadap temperatur (pada tekanan P=0,1, 5, 25, 25 dan 50MPa)	II-8
Gambar 2.4.2 Diagram fasa air pada bidang P-T	II-9
Gambar 2.4.3 Hubungan kerapatan, konstanta dielektrik dan ionisasi air terhadap temperatur	II-11
Gambar 2.4.4 Diagram reaksi hidrotermal sistem batch. (1) Reaktor; (2) Thermoelement; (3) Salt bath; (4) Kompor listrik; (5) Air pendingin (6) Sistem pengontrol temperatur	II-14
Gambar 2.5.1 Penurunan energi aktivasi dengan adanya enzim	II-17
Gambar 2.5.2 Model konversi hemiselulosa oleh enzim hemmiselulases	II-19
Gambar 2.5.3 Model kerja enzim selulase	II-20
Gambar 3.2.1 Desain peralatan air subkritis yang digunakan dalam studi ini	III-3
Gambar 3.4.1 Proses pembuatan kurva standar glukosa/xilosa	III-5
Gambar IV.1 Liquid hasil Pretreatment dengan reaktor subkritis	IV-5
Gambar IV.3 X-Ray difraktogram untuk selulosa murni	IV-9
Gambar IV.4 Grafik perbandingan X-ray diffraction untuk sabut kelapa tidak dipretreatment dan dengan yang dipretreatment	IV-10
Gambar IV.6 Kurva standar glukosa (dengan CMC)	IV-12

	untuk menguji keaktifan enzim selulase	
Gambar IV.7	Kurva standar glukosa (tanpa CMC) untuk menguji konsentrasi gula reduksi hidrolisis sabut kelapa	IV-15
Gambar IV.8	Perbandingan hasil hidrolisis sabut kelapa variabel I (20 bar), II (30 bar) dan III (40bar) (suhu 110°C)	IV-17
Gambar IV.9	Laju Hidrolisis Berdasarkan Teoritis dan Eksperimental	IV-18
Gambar IV.10	Perbandingan hasil hidrolisis sabut kelapa variabel IV (20 bar), V (30 bar) dan VI (40bar) (suhu 130°C)	IV-19
Gambar IV.11	Perbandingan hasil hidrolisis sabut kelapa variabel VII (20 bar), VII (30 bar) dan IX (40bar) (suhu 150°C)	IV-21
Gambar IV.12	Perbandingan hasil hidrolisis sabut kelapa variabel X (20 bar), XI (30 bar) dan XII (40bar) (suhu 170°C)	IV-23
Gambar IV.13	Perbandingan konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis semua variabel terhadap konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis tanpa <i>pretreatment</i>	IV-24

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1 Latar Belakang**

Saat ini isu pemanasan global yang disebabkan emisi gas rumah kaca terutama CO<sub>2</sub> akibat pembakaran bahan bakar fosil mendapat perhatian yang sangat luas dari berbagai pihak karena menyangkut keberlangsungan kehidupan di bumi ini. Bahan bakar fosil seperti, minyak bumi, batubara dan gas masih merupakan sumber energi utama dunia. Seberapa besar cadangan energi fosil dunia dan kapan sumber energi ini akan habis adalah pertanyaan yang fundamental. Dari data yang dipublikasi oleh *British Petroleum* pada tahun 2014, cadangan minyak bumi, batubara, dan gas adalah 11,6 tahun, 67 tahun, dan 41,6 tahun. (<http://www.bp.com/>)

Maka perlu dicari sumber energi baru dan terbarukan yang ramah lingkungan baik segi pemrosesan dan penggunaannya. Sumber energi yang tersedia dan jumlahnya melimpah di permukaan bumi adalah lignoselulosa. Indonesia merupakan negara tropis penghasil beragam jenis tumbuhan dan menghasilkan limbah pertanian sumber lignoselulosa yang melimpah, seperti debu sabut kelapa. Dengan produksi buah kelapa di Indonesia rata-rata 15,5 milyar butir/tahun, total bahan ikutan yang dapat diperoleh 3,75 juta ton air, 0,75 juta ton arang tempurung, 1,8 juta ton serat sabut, dan 3,3 juta ton debu sabut sebagai hasil samping. (Mahmud & Ferry, 2005)

Lignoselulosa adalah komponen organik di alam yang berlimpah dan terdiri dari tiga tipe polimer, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin (Fessenden dkk., 1998). Komponen ini, kecuali lignin, merupakan sumber penting untuk menghasilkan produk bermanfaat seperti gula dari proses fermentasi enzimatik, bahan kimia dan bahan bakar cair. Lignoselulosa bisa diperoleh dari bahan kayu, jerami, rumput-rumputan, limbah pertanian/hutan, limbah industri (kayu, kertas) dan bahan berserat

lainnya. Kandungan dari ketiga komponen lignoselulosa bervariasi tergantung dari jenis bahannya. (Anindyawati, 2009)

Lignoselulosa disintesis secara biologis melalui fotosintesis dan memiliki laju produksi  $10^{11}$  ton per tahun (Fessenden dkk., 1998). Bahan inilah yang kemudian dapat dihidrolisis enzimatis menjadi gula dan selanjutnya difermentasi membentuk biofuel. Bahan lignoselulosa adalah bahan yang terdapat dalam tanaman yang tersusun atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Struktur selulosa dilihat dari sambungan  $\beta$ -glikosida memberikan orientasi monomer-monomer glukosa yang terikat kuat satu sama lainnya. Ikatan-ikatan satu sama lain tersebut sering juga disebut ikatan glikosida  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (Zumdahl, 1992). Molekul selulosa seluruhnya berbentuk linear dan mempunyai kecenderungan kuat membentuk ikatan hidrogen antar molekul. Sebagai akibat dari struktur yang berserat dan ikatan-ikatan hidrogen yang sangat kuat, selulosa mempunyai kekuatan tarik yang tinggi dan tidak larut dalam kebanyakan pelarut (Sjöström, 1998; Hon dkk., 2001). Kajian dari beberapa laporan *paper* bahwa selulosa mempunyai struktur teratur (kristalin), maka selulosa sulit untuk dipretreatment menjadi gula sederhana melalui teknik konvensional hidrotermal maupun enzimatis (Toor dkk., 2011). Disamping selulosa dalam kayu maupun jaringan tanaman lainnya, terdapat sejumlah polisakarida yang disebut poliosa atau hemiselulosa. Hemiselulosa, tersusun atas polimer heterogen, 20-40% biomassa tanaman adalah bagian polisakarida yang cukup banyak terdapat pada tanaman dan sebagai sampah pada industri-industri etanol berbasis pati dan gula. Polimer ini tersusun atas berbagai unit gula, mempunyai rantai lebih pendek dan mempunyai percabangan rantai molekul tidak teratur (Girio dkk., 2010). Karena berbentuk *amorphous*, hemiselulosa (atau *xilan*) mempunyai derajat kristalin yang lebih rendah dari pada selulosa serta lebih mudah untuk dipretreatment menjadi gula sederhana melalui teknik hidrotermal maupun enzimatis (Fengel dkk., 1985).

Proses pretreatment lignoselulosa (termasuk penguraian lignin) dengan teknik konvensional (asam) pernah dilakukan dan berhasil merekayasa struktur kristal selulosa, dan meningkatkan kerja enzim pada proses hidrolisis (Chunping, dkk., 2008) dan (Spigno dkk., 2008). Perbedaan metode subkritis dan asam yaitu diperoleh bahwa metode air subkritis menghasilkan yield gula 9-13 % lebih rendah dari metode asam, tapi penggunaan enzimnya 33% lebih rendah dari metode asam. Hal yang terpenting dalam metode air subkritis adalah tidak menggunakan asam dan basa selama proses pretreatment (King et al., 2012).

Metode air superkritis sudah pernah dilakukan sebelumnya dan didapatkan beberapa kelemahan dan kelebihan. Kelebihannya adalah memiliki nilai yield glukosa yang lebih tinggi dalam waktu hidrolisis yang lebih singkat. Sedangkan kelemahannya adalah suhu air yang sangat tinggi sehingga memerlukan biaya yang lebih tinggi. (Zhang dkk, 2014)

Pretreatment selulosa murni telah dilakukan dengan metode air subkritis dan dilakukan analisis struktur molekuler terhadap variasi temperatur. Dari metode ini didapatkan bahwa terjadi transformasi struktur dari selulosa I menjadi selulosa II diatas temperatur 300 °C (Kumar dkk, 2010). Pretreatment bagas tebu dengan air subkritis dan NaOH telah dilakukan dan dianalisa perbandingan kedua metode ini. Setelah dilakukan analisis perbandingan, didapatkan bahwa yield glukosa dengan metode air subkritis adalah 0,45 (180°C) lebih tinggi dari pada metode NaOH, yield 0,34 (NaOH.4M) (Ju dkk., 2011). Bahan lignoselulosa, *corn stover* dan *switchgrass* telah dikonversi menjadi gula dengan pretreatment air subkritis dengan menggunakan gas CO<sub>2</sub> sebagai penekan. Komposisi kimia dari *corn stover* adalah selulosa 37% dan hemiselulosa 21%. Sementara komposisi *switchgrass* adalah masing-masing, selulosa 31%, hemiselulosa 22% (Esteghlalian dkk., 1997; Wiselugel dkk., 1996). Metode air subkritis dalam mengdegradasi bahan lignoselulosa mempunyai keunggulan, di antaranya adalah menggunakan teknologi ramah lingkungan, air bertindak sebagai



katalis dan reaktan, mudah penanganan dan pengoperasiannya karena suhu dan tekanan relatif rendah. Metode air subkritis telah dilakukan untuk mengdegradasi lignoselulosa dan selulosa murni menjadi strukur amorf dan metode ini dapat melarutkan gula reduksi dari lignoselulosa dalam air dalam keadaan subkritis (Ju dkk., 2011)

Zhao dkk., 2011 mengkombinasikan metode air subkritis air dan air superkritis untuk melakukan pretreatment pada selulosa murni. Pretreatment ini berhasil mendapatkan yield glukosa 31,5% dengan temperatur air subkritis 240°C. Jerami gandum (selulosa 40% dan xilan 26%) dikonversi menjadi oligosakarida dan selanjutnya menjadi gula dengan metode kombinasi air subkritis dan superkritis. Produksi yield gula adalah 6,7% dari berat bahan mentah kering, temperatur 280°C dan waktu reaksi 54 detik (Zhao et al., 2009).

Pretreatment dengan metode air subkritis umumnya telah dilakukan pada lignoselulosa berkadar lignin relatif rendah (Tabel 1.1). Pretreatment lignoselulosa dengan air subkritis dan super kritis tanpa melewati delignifikasi dengan NaOH. Proses delignifikasi terjadi secara langsung pada saat pretreatment air sub dan superkritis pada temperatur 350-400°C (Toor et al., 2011). Laporan dari Pasquini dkk., 2005 mendapatkan bahwa pretreatment lignoselulosa (bagas tebu dan kayu *pinus taeda*) dengan kombinasi air-etanol subkritis berhasil mendegradasi lignin sampai 90,5%.

Namun demikian, belum ada kajian yang membandingkan antara pretreatment air subkritis dengan gas penekan N<sub>2</sub> pada bahan lignoselulosa berlignin tinggi terhadap yield gula. Untuk itu perlu dikaji lebih lanjut hubungan antara pretreatment SCW dengan menggunakan gas penekan N<sub>2</sub> pada lignoselulosa berlignin tinggi dan yield gula.

**Tabel 1.1 Komposisi kimia bahan lignoselulosa**

No	Bahan lignoselulosa	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)	Referensi
1	Bagas tebu	40,9	20.8	24.8	Qiu dkk., 2012; Cao dkk., 2013; Su dkk., 2012
2	Kayu poplar	41,9	-	23	Yuan dkk., 2012
3	Limbah kayu poplar	47	-	26	Liu dkk., 2011
3	Jerami gandum	42,68	34,45	12,59	Li dkk., 2009
		40		26	Zhao dkk., 2009
4	Jerami padi	35,06	17,98	15,24	Jiang dkk., 2011
		41	25	9	Li et dkk., 2009
5	Kayu spruce	44	8,4	27	Shafiei dkk., 2013
6	Bambu	-	-	26,45	Muhammad dkk., 2011
7	Kayu sugi	43	27	25	Watanabe 2010

Metode air subkritis dengan gas penekan N<sub>2</sub> memiliki kelebihan yang menarik oleh karena sifatnya yang inert. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan konversi bahan lignoselulosa berlignin tinggi menjadi gula reduksi dengan menggunakan metode air subkritis. Adapun prosedur singkat pekerjaan ini adalah bahan baku dikeringkan selama beberapa hari, digiling, dan kemudian diayak. Tahap selanjutnya adalah

pretreatment biomassa (100-120 mesh) dengan menggunakan air subkritis dengan penekan N<sub>2</sub>. Setelah pretreatment, struktur substrat dianalisa menggunakan XRD (*X-Ray Diffraction*). Gula yang didapat dari hasil hidrolisis SCW dan enzimatik diukur dengan analisa DNS (*dinitrosalicylic acid*).

## **I.2 Perumusan Masalah**

- a. Selulosa dan hemiselulosa pada bahan lignoselulosa sangat sulit dipretreatment dengan teknik enzimatik karena mereka terlindungi oleh lignin dan ikatan hidrogen antar molekul pada gugus OH.
- b. Metode pretreatment lignoselulosa dengan teknik konvensional menggunakan asam memiliki kelemahan karena asam sangat sulit didaur ulang sehingga mencemari lingkungan. Untuk itu perlu metoda pretreatment yang ramah lingkungan dan dapat dilakukan pada kondisi suhu dan tekanan moderat.
- c. Dalam proses degradasi lignoselulosa, perlu diketahui peran air subkritis dalam mendegradasi lignoselulosa saat *pretreatment*.

## **I.3 Batasan Masalah**

1. Bahan baku yang digunakan berupa sabut kelapa yang diperoleh dari Sulawesi Utara.
2. *Pretreatment* yang dilakukan dengan metode air subkritis dengan variabel tekanan dan suhu dan menggunakan reaktor *batch*.
3. Hidrolisis yang dilakukan dengan menggunakan enzim selulase.

## **I.4 Tujuan Penelitian**

- a. Melakukan pembuatan gula reduksi dari sabut kelapa menggunakan *pretreatment* air subkritis dengan gas penekan nitrogen.
- b. Menemukan suhu dan tekanan optimum untuk *pretreatment* sabut kelapa menggunakan air subkritis dan gas penekan nitrogen.

### **I.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

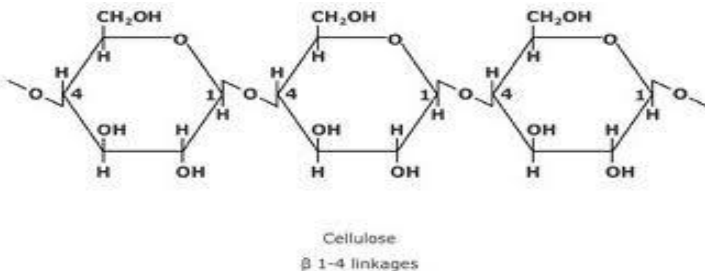
1. Memanfaatkan limbah sabut kelapa yang selama ini hanya dianggap sebagai limbah pertanian.
2. Mendapatkan hak cipta dan paten atas penelitian tentang pembuatan gula dari debu sabut kelapa dengan proses air subkritis dalam rangka menghasilkan biofuel dalam bentuk bioetanol dan biohidrogen.
3. Secara tidak langsung turut berperan dalam penghematan penggunaan bahan bakar fosil.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Bahan Lignoselulosa

Biomassa lignoselulosa telah diidentifikasi sebagai bahan terbaik untuk produksi biofuel. Hal ini dikarenakan biomassa lignoselulosa mengandung sekitar 75% gula polisakarida. Lignoselulosa tersusun atas lignin, karbohidrat seperti selulosa dan hemiselulosa, pektin, protein, abu, garam dan mineral-mineral. (Van Dyk & Pletschke, 2012). yang merupakan komponen penyusun utama tanaman dan serat alamiah. Prosentasi ketiga komponen ini berbeda pada tanaman, sebagai contoh kayu keras prosentasi selulosa (49%), hemiselulosa (25%), dan lignin (22%).



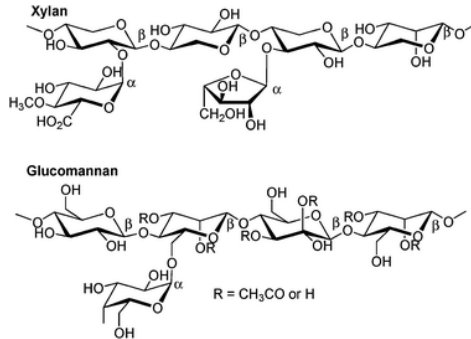
**Gambar 2.1.1 Struktur selulosa (Fengel & Wegener, 1989)**

Struktur selulosa (Gambar 2.1.1), mempunyai rumus kimia  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , dilihat dari sambungan β-glikosida memberikan orientasi monomer-monomer glukosa terikat kuat satu sama lainnya melalui ikatan glikosida β(1→4) (Zumdhahl 1992; Hon dkk., 2001). Selulosa merupakan suatu rantai glukosa yang diikat dengan ikatan β-1,4. Ikatan-ikatan ini disatukan dengan suatu ikatan hidrogen yang sangat kuat sehingga membentuk suatu rantai selulosa hingga mikrofibril, membuat struktur kristalin dalam alam dan sangat susah didegradasi (Van Dyk & Pletschke, 2012). Selulosa juga terhalang dengan ikatan hidrogen pada

gugus OH dan lignin sehingga menyulitkan enzim untuk memutuskan selulosa menjadi glukosa. Molekul selulosa seluruhnya berbentuk linear dan mempunyai kecenderungan kuat membentuk ikatan hidrogen intra-molekul. Berkas molekul selulosa membentuk agregat bersama dalam bentuk mikrofibril, tempat yang sangat teratur (kristalin) dan diselingi tempat yang tidak teratur atau amorf. Sebagai akibat dari struktur yang berserat dan ikatan-ikatan hidrogen yang sangat kuat, selulosa mempunyai kekuatan tarik yang tinggi dan tidak larut dalam kebanyakan pelarut (Sjöström 1998; Hon dkk., 2001). Karena selulosa mempunyai struktur teratur (*kristalin*), maka selulosa sulit untuk dipretreatment menjadi gula sederhana melalui teknik konvensional hidrotermal maupun enzimatik (Toor dkk., 2011).

Disamping selulosa dalam kayu maupun jaringan tanaman lainnya terdapat sejumlah polisakarida yang disebut poliosa atau hemiselulosa. Golongan dari fraksi-fraksi hemiselulosa ini bergantung pada tipe gula yang ditemukan. Monomer-monomer yang ditemukan dalam hemiselulosa adalah *D-xilosa*, *D-manosa*, *D-galaktosa* dan *L-arabinosa* dan termasuk juga *xilan*, *mannan*, *galaktan* dan *arabinan* sebagai *heteropolymer* utama. Hemiselulosa disebut juga xilan yang merupakan penyusun utama hemiselulosa sebagian besar memiliki monomer D-xilosa. Xilan tersusun atas ikatan-ikatan rantai bercabang dari  $\beta$ -(1 → 4) dan rantai tak bercabang *D-xylopiranosa* (Bastawde 1992).

Hemiselulosa (Gambar 2.1.2) merupakan suatu struktur karbohidrat kompleks yang terdiri dari polimer monosakarida yang berbeda seperti pentosa (xilosa dan arabinosa), heksosa (manosa, glukosa dan galaktosa), dan gula asam (Hanim *et al*, 2014) Hemiselulosa tersusun atas berbagai unit gula, rantai lebih pendek dan mempunyai percabangan rantai molekul yang tidak teratur (Girio dkk., 2010).. Karena hemiselulosa mempunyai struktur kurang teratur (*amorf*), maka hemiselulosa lebih mudah untuk dipretreatment menjadi gula sederhana melalui teknik hidrotermal maupun enzimatik.



**Gambar 2.1.2 Struktur hemiselulosa (Sjöström 1993)**

Lignin terdiri dari suatu fenilpropana seperti *p-coumaryl*, *coniferyl*, *guaiacyl*, *syringyl* dan *sinapyl alcohol* dan sangat susah didegradasi (Van Dyk & Pletschke, 2012). Lignin (Gambar 2.2.1) adalah bahan biomass bersama selulosa dan hemiselulosa sebagai penyusun utama tanaman. Dengan teknologi pretreatment konvensional, pada temperatur rendah (di atas sedikit 100°C) lignin terurai menjadi methoxy phenols dengan menggunakan teknik hidrolisis. Hidrolisis lignin menggunakan katalis alkalin atau NaOH menghasilkan residu dan menjadi penghalang (*inhibitor*) pada proses enzimatik untuk mengkonversi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi (Toor dkk., 2011).

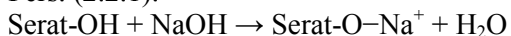
## II.2 Delignifikasi dan Pretreatment Lignoselulosa

Sebelum bahan selulosa dan hemiselulosa digunakan sebagai bahan baku pembuatan gula, kedua bahan tersebut harus diekstrak dari bahan lignoselulosa. Proses delignifikasi bahan lignoselulosa dapat menggunakan metode ekstraksi *chlorination* dan *alkalin*. Ada hubungan linear antara delignifikasi dan hasil dari proses hidrolisis lignoselulosa menjadi gula (Koullas dkk., 1993).

Bahan lignoselulosa dari bagas tebu (SCB) dilakukan delignifikasi dengan menggunakan kombinasi NaOH dan ekstrak enzim *ligninolytic* yang dihasilkan dari *Pleurotus ostreatus* IBL-

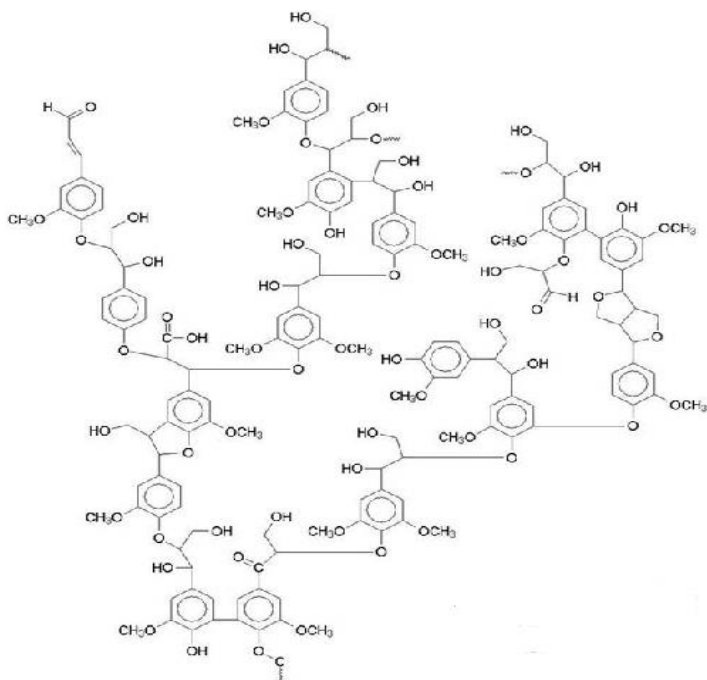
02 dengan maksud untuk melakukan depolimerisasi lignin dan selulosa. Dengan pretreatment alkalin (4% NaOH) dan enzim ligninolytic (25 mL) menyebabkan delignifikasi masing-masing, 48,7 dan 33,6%. Setelah dilakukan proses hidrolisis dan fermentasi pada kedua substrat menghasilkan bio etanol 18,2 and 16,3 g/L. (Asgher dkk., 2013). Studi pretreatment bahan lignoselulosa dari daun kelapa dilakukan dengan teknik alkalin dan chlorite. Metode ini memperlihatkan peningkatan kandungan mikrofibril dari 0,373 kg /kg menjadi 0,896 kg/ kg setelah aplikasi chlorite dan ekstraksi alkalin pada lignin dan hemiselulosa. Indeks kristalinitas yang diperoleh dari XRD dan FTIR dari sampel sebelum perlakuan dan setelah perlakuan ditemukan masing-masing 42,3 dan 47,7. Indeks kristalinitas meningkat karena menurunnya kandungan lignin dan hemiselulosa dalam proses delignifikasi ini. Dari studi ini didapatkan bahwa diameter microfibril pada jangkauan 10-15 $\mu$ m (Maheswari dkk., 2012).

Telah diketahui bahwa kristal lignoselulosa terhubung satu sama lain melalui grup OH. Pretreatment bahan lignoselulosa dengan alkalin dapat merusak bahkan memutuskan ikatan ini melalui reaksi pada Pers. (2.2.1).



Dari analisis kimia dari serat didapatkan bahwa sebagian besar selulosa dapat diregenerasi dan prosentasi lignin turun secara signifikan sebesar 18%. Namun demikian, terjadi kenaikan indeks kriticalinitas pada pretreatment NaOH pada orde 43% untuk 5% NaOH. Hal ini terjadi karena adanya pelarutan hemiselulosa (amorpous) sehingga bahan akan menjadi lebih teratur. Pada konsentrasi NaOH lebih besar dari 5%, mulai terjadi perubahan struktur dari selulosa I menjadi selulosa II (Sghaier dkk., 2012).





**Gambar 2.2.1 Struktur lignin (Sjöström 1993; Fengel & Wegener 1989)**

### **II.3 Komposisi Kimia Lignoselulosa dalam sabut kelapa (Husk Composition)**

Lignoselulosa dengan varietas dan kematangan berbeda ternyata mempunyai sifat fisik dan komposisi berbeda. Rata-rata sabut kelapa kering mempunyai besar kerapatan sekitar ( $\rho_{\text{coir}} = 1,2\text{--}1,3 \text{ g/cm}^3$ ). Sabut kelapa yang merupakan residu berlignoselulosa, mengandung 39,31% alphaselulosa, 16,15% hemiselulosa, 29,79% lignin dan 28,48% ekstraktif (Vaithanomsat, dkk 2011). Berikut merupakan komponen kimiawi dari sabut kelapa

**Tabel 2.3.1 Komponen kimiawi sabut kelapa (Prado *et al*, 2014)**

<b>Komponen</b>	<b>%massa (<i>wet basis</i>)</b>
<i>Moisture</i>	10,66±0,05
Abu	0,92±0,01
Komponen larut air	3,8±0,2
Komponen larut ethanol	1,5±0,3
Protein	0,9±0,2
Lignin larut asam	1,61±0,07
Lignin tidak larut asam	33±3
Gula	
Glucan	15±2
Xilan	19±2
Galaktan	0,09±0,02
Arabinan	0,27±0,02
Mannan	0,020±0,003

## **II.4 Sub dan superkritis**

### **II.4.1 Pengantar Sub dan Superkritis**

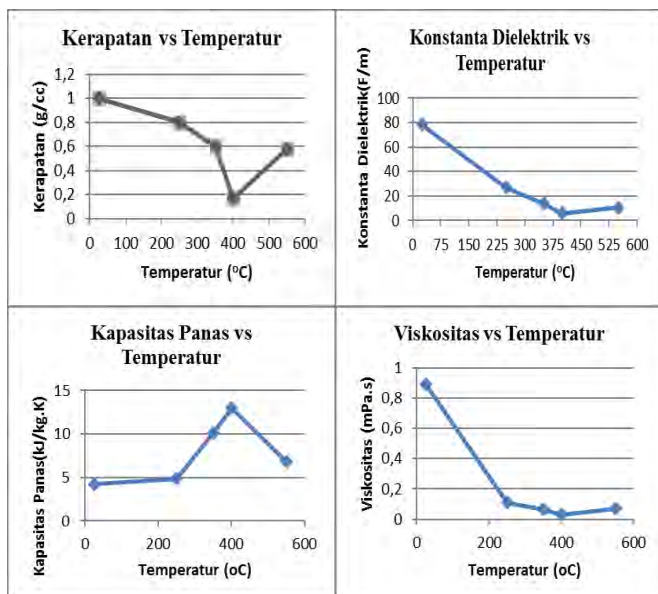
Fluida sub dan superkritis memiliki properti yang sangat unik dibandingkan dengan air biasa. Berikut adalah properti air pada berbagai kondisi.

**Tabel 2.4.1 Properti air pada berbagai kondisi (Toor *et al*, 2011)**

	Air biasa	Air subkritis		Air Superkritis	
Temperatur (°C)	25	250	350	400	400
Tekanan (MPa)	0,1	5	25	25	50
Density (g cm <sup>-3</sup> )	1	0,80	0,6	0,17	0,58
Konstanta Dielektrik (F m <sup>-1</sup> )	78,5	27,1	14,07	5,9	10,5
Ionic product, pK <sub>w</sub>	14,0	11,2	12	19,4	11,9
Heat capacity C <sub>p</sub> (kJ kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	4,22	4,86	10,1	13,0	6,8
Viskositas dinamik (mPa s)	0,89	0,11	0,064	0,03	0,07

Terlihat bahwa konstanta dielektrik air semakin menurun pada kondisi subkritis dan superkritis sehingga, air mampu untuk melarutkan bahan organik seperti karbohidrat, protein dan lemak. Kelarutan dari bahan pada temperatur dan tekanan di atas titik kritis dari solvent mempunyai aplikasi sangat penting untuk proses pemisahan superkritis. Sebagai contoh, ekstraksi kafein dari serbuk kopi dan pemisahan sisa aspal dari fraksi minyak bumi (Smith, dkk., 1996). Beberapa aplikasi fluida superkritis antara lain ekstraksi kafein, kolestrol dari makanan, nikotin dari rokok, aseton dari antibiotik, bahan organik dari air, pemindahan monomer, oligomer dari fraksinasi polimer, fraksinasi polimer dan pemisahan (Perry dkk., 1999). Pada titik subkritis air mempunyai sifat yang sangat menarik di antaranya viskositas

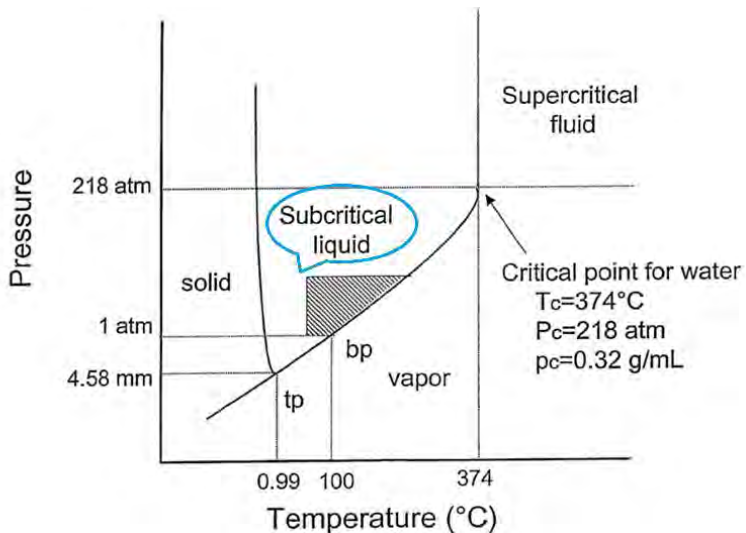
yang rendah, solubilitas tinggi dari bahan organik sehingga membuat air subkritis medium yang sangat baik untuk kecepatan dan homogenitas reaksi yang efisien. Sebagai contoh dalam proses hidrolisis selulosa, didapat solubilitas glucose 0,453%. Konstanta dielektrik turun dari 78,5F/m menjadi 14,07 pada subkritis dan 5,9F/m pada superkritis. Sifat ini sangat menarik untuk solubilitas dari senyawa-senyawa organik seperti *fatty acids*.



**Gambar 2.4.1 Sifat fisik air (kerapatan, konstanta dielektrik, kapasitas panas, dan viskositas) terhadap temperatur (pada tekanan  $P=0,1, 5, 25, 25$  dan  $50\text{MPa}$ ) (Sumber Toor dkk., 2011)**

Posisi daerah fluida superkritis dapat ditunjukkan pada diagram  $P$ - $T$  atau diagram  $P$ - $V$ . Daerah superkritis adalah daerah di atas titik kritis pada diagram  $P$ - $T$  dan  $P$ - $V$  seperti yang diperlihatkan pada Gambar 2.4.1. Secara umum bahwa ketika campuran cairan dan gas pada kondisi kesetimbangan dipanaskan,

menyebabkan ekspansi termal, cairan akan menjadi kurang rapat. Pada saat yang sama, gas akan menjadi lebih rapat ketika tekanan dinaikkan, dan pada titik kritis, kerapatan menjadi identik. Suatu keadaan superkritis didefinisikan sebagai temperatur dan tekanan fluida di atas temperatur kritis,  $T_c$ , dan tekanan kritis,  $P_c$ . Pada titik transisi, sifat fisik fasa cair dan gas merupakan sifat kombinasi yang memungkinkan keadaan ini sangat cocok untuk proses-proses yang baru seperti degradasi bahan-bahan polimer yang tidak mungkin dilakukan oleh substansi dalam keadaan normal (Wen 2009).



**Gambar. 2.4.2 Diagram fasa air pada bidang P-T**

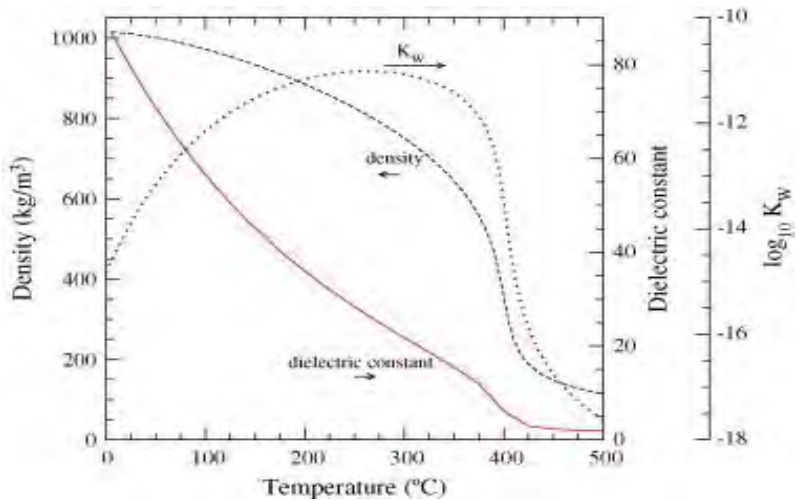
Terlihat pada Gambar 2.4.2 bahwa untuk mendapatkan air pada kondisi superkritis membutuhkan tekanan yang sangat besar dan suhu yang tinggi pula. Dengan kemiripan properti air pada kondisi subkritis dan superkritis, membuat air superkritis kurang diminati oleh karena untuk mendapatkannya butuh tekanan tinggi dan suhu tinggi. Sehingga, *pretreatment* air subkritis menjadi metode yang lebih baik dibandingkan *pretreatment* air superkritis.

Teknik superkritis dalam produksi bahan bakar bio diesel dan gas telah direview oleh Wen D., dkk., (2009), penulis membandingkan antara teknologi konvensional dan teknologi superkritis. Teknologi superkritis memiliki keunggulan, seperti proses yang cepat dan tanpa katalis. Karena operasi dalam keadaan temperatur dan tekanan tinggi, metode sub kritis memerlukan bahan khusus tentunya memerlukan biaya desain dan konstruksi lebih besar dari pada metode konvensional. Studi kinetika secara detail tentang konversi selulosa pada kondisi air sub dan superkritis telah dilakukan pada tekanan 25Mpa dengan waktu konversi pendek dari 0,02 sampai 13,1 detik. Model reaksi bertujuan untuk meverifikasi mekanisme reaksi yang terjadi dan kemudian menemukan model laju reaksi pada kondisi sub dan superkritis (Sasaki dkk., 2004).

#### **II.4.2 Review Teoritis Fluida Sub dan Superkritis**

##### **Konstanta ionisasi dan dielektrik air**

Sifat fisik dari air, seperti viskositas, kerapatan, konstanta dielektrik dan ionic dapat direkayasa dengan perubahan tekanan dan temperatur. Air adalah molekul polar membentuk jaringan ikatan-H antar molekul dan mempunyai solubilitas buruk pada sebagian besar bahan organik. Ketika air dipanaskan, ikatan-H mulai melemah sehingga terjadi disosiasi air menjadi  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$ . Pada subkritis air, konstanta ionisasi ( $K_w$ ) air meningkat dengan temperatur pada orde 3 dari orde air dalam keadaan normal seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4.3 (Peterson dkk., 2008). Di lain pihak konstanta dielektrik air turun dari 80 menjadi 20, yang memungkinkan pelarutan bahan organik dalam subkritis air (Kumar dkk., 2010)



**Gambar 2.4.3 Hubungan kerapatan, konstanta dielektrik dan ionisasi air terhadap temperatur (Peterson dkk., 2008)**

Dari studi yang lain memperlihatkan bahwa ionik dari air ( $K_w$ ) juga sangat tinggi di daerah subkritis sekitar  $10^{-12}$  (1 bar keadaan normal  $10^{-14}$ ). Level ionik yang tinggi dari  $H^+$  dan  $OH^-$  pada subkritis air artinya bahwa banyak reaksi asam basa yang terjadi dan bertindak sebagai katalis. Ion  $H^+$  bertindak sebagai pengdegradasi lignin dan  $OH^-$  sebagai pendegradasi hemiselulosa pada proses hidrolisis lignoselulosa menjadi gula. Kerapatan air pada subkritis adalah pada jangkauan antara kerapatan normal dan kerapatan superkritis, maka dapat dilakukan proses gasifikasi bahan-bahan biomass, seperti selulosa dan bahan berbasis organik karena ion  $H$  dan  $OH$  bereaksi dengan radikal menghasilkan gas. Bahan yang paling banyak digunakan dalam teknik sub dan superkritis adalah air dan karbon dioksida. Sifat kritis dari air adalah, temperatur kritis 647,3K, tekanan kritis 22,12Mpa, kerapatan 0,348g/cc, sedangkan karbon dioksida adalah, 304,1K, 7,38Mpa dan 0,469g/cc (Toor dkk., 2011).

#### **II.4.3 Perkembangan Teknologi Sub dan Superkritis dalam Degradasi Lignoselulosa**

Telah dilaporkan melalui review tentang bagaimana memproduksi etanol lignoselulosa mulai dari bahan baku sampai pada produk akhir etanol (Schacht dkk., 2008). Selulosa dapat dilakukan pretreatment dan juga dapat terhidrolisis sebagian di dekat titik kritis air, dan CO<sub>2</sub> dapat digunakan sebagai katalis. Kemudian untuk menkonversi sisa selulosa dilanjutkan dengan teknik enzimatik. Namun demikian, etanol dari bahan lignoselulosa belum pada tahap komersialisasi. Ada beberapa penguatan teknologi yang harus dilakukan sebelum tahap komersialisasi. Teknologi superkritis mempunyai keuntungan untuk diaplikasikan dalam beberapa tahapan proses tetapi secara keseluruhan kombinasi teknologi yang dapat mencapai hasil yang baik. Kombinasi itu adalah antara bioteknologi dan teknologi tekanan tinggi.

Limbah jagung dan gandum telah berhasil dihidrolisis menjadi gula pada kondisi sub dan superkritis dari air (Zhao dkk., 2009). Dari kajian ini bahwa kondisi superkritis optimum adalah 384°C, waktu reaksi 19 detik. Rasio padatan-cairan optimum dalam produksi oligosakarida adalah 20 mg/2.5 ml air untuk kedua substrat limbah jagung dan gandum. Hasil tertinggi gula hexose yang didapat adalah 27,4% dari limbah jagung pada 280 °C, selama 27 detik, dan jerami gandum 6,7% pada 280 °C, selama 54 detik. Peralatan yang digunakan adalah batch system tanpa menggunakan pengukur tekanan, dimana reactor direndam dalam bak berisi air garam (*salt bath*), sedangkan tekanan didapat dari persamaan keadaan.

Banyak laporan yang telah dipublikasikan tentang produksi gula langsung dari proses degradasi lignoselulosa pada kondisi sub dan superkritis. Hidrolisis selulosa dengan teknik campuran etanol/air pada subkritis merupakan teknik menjanjikan untuk memperoleh gula kemudian diproses menjadi etanol. Hasil gula dicapai 98,22% pada kondisi fraksi mol etanol 0,22, temperatur



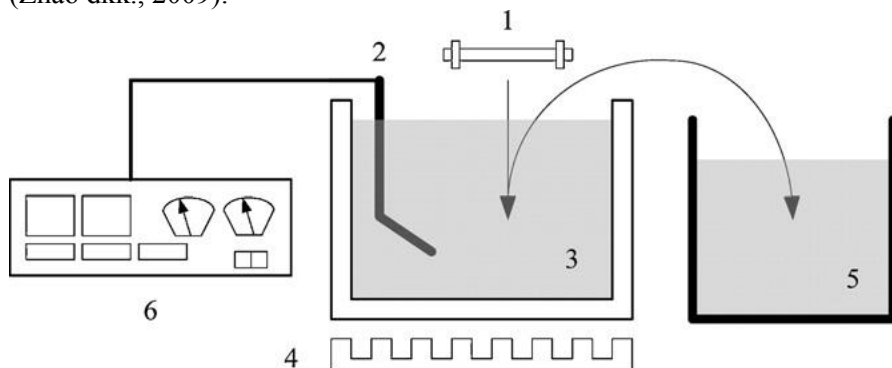
260°C, tekanan 5,75Mpa, waktu reaksi 35 detik. Dari pengukuran indeks Kristal turun menjadi 0,211 dari 0,618 (Wang dkk., 2012).

Untuk mencapai hasil maksimum telah digunakan juga kombinasi teknik sub dan superkritis untuk menghidrolisis selulosa untuk menghasilkan gula hexos. Teknik kombinasi artinya, bahan lignoselulosa pertama didegradasi pada kondisi superkritis menghasilkan olisakarida, kemudian dilanjutkan hidrolisis pada subkritis untuk menghasilkan gula. Dari kajian ini didapat pembentukan hexos meningkat dengan kenaikan temperatur subkritis dan kemudian turun setelah nilai maksimum diperoleh. Perolehan maksimum hexos dari selulosa adalah  $31,5\% \pm 1,4\%$ , dengan kondisi : konsentrasi selulosa  $3,53 \pm 0,24$  g/L, temperatur superkritis 380 °C, waktu reaksi  $9,70 \pm 0,66$  s, temperatur subkritis 240 °C, waktu subkritis  $49 \pm 3,31$  s. Konsentrasi optimum selulosa adalah sekitar 3,5 g/L dan waktu reaksi 9–10 s untuk proses superkritis dan 45–50 s untuk proses subkritis (Zhao dkk., 2011).

Zhao dkk., (2012) melakukan optimasi teknik kombinasi sub dan superkritis air dalam melakukan degradasi bahan lignoselulosa untuk produksi gula hexose. Hasil oligosaccharide tercapai 30%, waktu reaksi 6–10 s pada at 375 °C. Dengan menggunakan bahan baku limbah jagung (*corn stalk*) didapat gula hexose 30% pada kondisi optimal superkritis (380 °C, 23–24 Mpa, 9–10 s) dan subkritis (240 °C, 8–9 Mpa, 45–50 s).

Suatu kombinasi teknologi sub dan superkritis air digunakan sebagai pretreatment dan sekaligus hidrolisis untuk menghasilkan etanol dari bahan lignoselulosa. Dalam proses hidrolisis superkritis ini menggunakan sistem batch (Gambar 2.4.4), 60mg Kristal selulosa dalam 2,5mg air (*deionized Water*) dimasukkan kedalam reaktor dan dipanaskan dalam *salt bath* pada temperatur dan waktu reaksi tertentu. Selulosa dengan cepat terhidrolisis menjadi oligosakarida, hexose dan produk molekuler lainnya pada temperatur di atas titik kritis air. Temperatur dan waktu reaksi adalah dua parameter yang menentukan produk hidrolisis selulosa. Hasil olisakarida tertinggi 40% diperoleh pada

temperatur 380 °C dan waktu reaksi 16 s. Hasil hexose adalah 24%, memberikan hasil maksimum produk hidrolisis 63%. Adapun diagram peralatan yang digunakan dalam studi ditunjukkan pada Gambar 2.4.4. Hasil lain adalah, pada temperatur di atas 380°C terjadi reaksi balik yang sangat cepat atau dekomposisi gula menjadi produk yang tidak diinginkan (Zhao dkk., 2009).



**Gambar 2.4.4 Diagram reaksi hidrotermal sistem batch. (1) Reaktor; (2) Thermoelement; (3) Salt bath; (4) Kompor listrik; (5) Air pendingin (6) Sistem pengontrol temperatur. (Zhao dkk., 2009)**

Selulosa mikrokristalin dilakukan pretreatment pada air subkritis dalam reaktor kontinu dengan tujuan untuk memperkuat reaktifitas enzim *selulase* pada proses hidrolisis/konversi selulosa menjadi glukosa. Suspensi selulosa/dicampur dengan air dan kemudian dimasukan ke dalam reaktor di mana tekanan dan temperatur dijaga konstan (Kumar dkk., 2010). Dari review Toor dkk., (2011) bahwa teknik air subkritis adalah sangat menjanjikan jika dilihat dari konsumsi energi dan proses integrasi. Energi recovery dari biomass khususnya pati dan gula terhadap bahan bakar sekitar 80%. Secara teori dan telah dibuktikan secara eksperimen, gula dan pati menghasilkan etanol 0,5g/g dan energy

recovery sekitar 88%. Namun demikian, bahan baku lignoselulosa menghasilkan jauh lebih rendah 30% ekivalensi dengan energy recovery 50%.

Air sebagai solven pada kondisi subkritis untuk mengekstrak substansi organik dilakukan dan dilaporkan oleh beberapa penulis yang dirangkum oleh Carr dkk., (2011). Kesimpulan bahwa air subkritis sangat baik untuk digunakan sebagai solven karena ramah lingkungan untuk ekstraksi bahan organik dan teknik ini mengurangi waktu ekstraksi sebesar 50% dari teknik ekstraksi konvensional.

Degradasi lignoselulosa dari bagas tebu telah dilakukan dengan membandingkan teknik kondisi basa NaOH dan teknik air subkritis (Ju dkk., 2011). Penulis menganalisis pengaruh kondisi basa dan kemudian air subkritis terhadap solubilitas bagas tebu. Dari kajian didapatkan bahwa substrat berhasil terurai menjadi komponen penyusunnya, xilosa, glukosa, galaktosa, mannose, rhamnosa dan uronic acid, begitu juga lignin terurai menjadi *p-coumaric acid*, *ferulic acid*, *vanilline*, *syringic acid*, *5-hydroxymethyl-furfural*, *p-hydroxybenzoic* klason lignin.

Prado *et al* (2014) melakukan suatu eksperimen untuk mendapatkan gula dari beberapa bahan seperti sabut kelapa, biji anggur yang sudah dihilangkan lemaknya dan serat kelapa sawit yang sudah ditekan dengan menggunakan air subkritis. Dimana kandungan gula yang didapatkan adalah sebagai berikut

**Tabel 2.4.1 Komponen sakarida dan inhibitor setelah 30 menit *subcritical water pretreatment* (Prado *et al*, 2014)**

Komponen	Sabut Kelapa (gr / 100 gr raw material)	Biji Anggur (gr / 100 gr raw material)	Serat Kelapa Sawit (gr / 100 gr raw material)
Gula			
Arabinosa	0,23	0,03	0,43
Fruktosa	0,32	0,09	0,03
Galaktosa	0,12	0,06	0,12
Glukosa	1,17	0,20	0,14
Manosa	0,02	0,05	0,06
Xilosa	1,58	0,23	0,77
Selobiosa dan Selotriosa	0,14	0,05	0,19
Monosakarida lain	3,43	0,65	1,54
Inhibitor			
Furfural	7,49	0,84	1,16
5-hydroxymethylfurfural	0,75	0,04	0,09
Asam 4-hidroksibenzoat	1,00	0,007	0,52
Vanilin	0,04	0,02	0,03

#### **II.4.4 Penggunaan gas Nitrogen sebagai gas penekan**

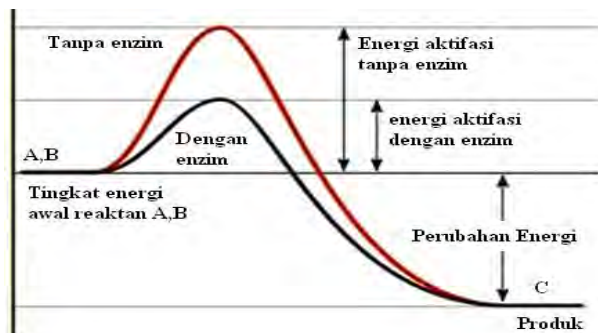
Untuk membuat air mencapai kondisi subkritisnya perlu ada peranan gas penekan sehingga air dapat berada pada kondisi mendekati titik kritisnya. Ada beberapa gas penekan yang digunakan hingga saat ini seperti karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dan nitrogen (N<sub>2</sub>). Beberapa penelitian menggunakan salah satu dari kedua gas ini untuk membuat kondisi subkritis air.

Otzurk *et al* (2010) menggunakan air subkritis untuk melakukan *pretreatment* pada tanaman *kenaf* (*Hibiscus*

*cannabinus L.*). Otsurk menggunakan gas CO<sub>2</sub> dan nitrogen sebagai gas penekan. Hasil yang didapatkan,

## II.5 Hidrolisis Enzimatik

Dalam sel hidup, enzim bertindak sebagai katalis secara biologis. Enzim adalah biokatalis yang diproduksi oleh jaringan makhluk hidup, yang berfungsi untuk mengkatalisa reaksi-reaksi yang terjadi dalam jaringan. Jadi sebagai katalis dapat mempercepat reaksi kimia. Molekul enzim tiga dimensi mempunyai tempat aktif (*active site*), suatu tempat yang akan melakukan interaksi dengan molekul kimia yang spesifik. Enzim dapat melakukan orientasi dari substrat ke suatu posisi yang dapat meningkatkan probabilitas suatu reaksi kimia.

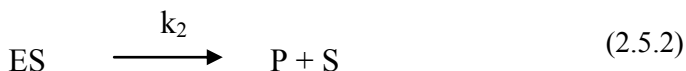


**Gambar 2.5.1 Penurunan energi aktivasi dengan adanya enzim**

Pasangan enzim-substrat terbentuk hanya sementara yang dapat menurunkan potensial penghalang yang disebut energi aktivasi dari reaksi (Tortora dkk., 2007).

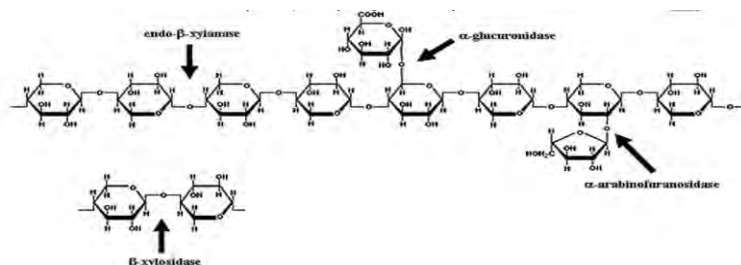
Peranan dari enzim yang paling diketahui bahwa enzim menurunkan energi aktivasi dari suatu reaksi kimia (Gambar 2.5.1). Mekanisme reaksi kerja enzimatik mempunyai beberapa tahapan, yaitu: (1). Permukaan dari substrat melakukan kontak dengan suatu daerah spesifik pada permukaan molekul enzim yang disebut tempat aktif. (2). Terjadi pembentukan senyawa antara yang bersifat sementara disebut paduan enzim-substrat

(*enzyme-substrat complex*). (3). Molekul substrat ditransformasi dengan penyusunan kembali atom-atom, pemutusan molekul substrat, kombinasi dengan molekul substrat lainnya. (4). Molekul substrat yang telah ditransformasi menghasilkan produk yang dilepaskan dari molekul enzim karena tidak ada lagi kesesuaian dengan tempat aktif dari enzim. (5). Enzim yang tidak mengalami perubahan menjadi bebas untuk bereaksi dengan molekul substrat lainnya (Tortora dkk., 2007). Paduan ini kemudian terputus membentuk produk dan kemudian teregenerasi menjadi enzim bebas. Mekanisme satu reaksi enzim-substrat dapat ditulis sebagai (Lee 1992):



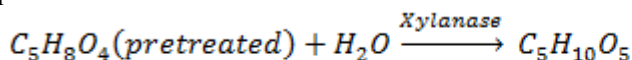
### Enzim Xilanase

Hemiselulosa adalah polimer heterogen yang tersusun atas pentosa (D-xilosa, D-arabinosa), dan hexosa (D-mannosa, D-glukosa, D-galaktosa). Hemiselulosa dalam kayu yang agak keras terutama disusun oleh xilan, sementara pada kayu yang lunak adalah glukoman. Ada beberapa enzim yang bertanggung-jawab untuk pretreatment hemiselulosa (Gambar 2.5.2). Dalam pretreatment xilan, enzim endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dan acetyl xilan esterase, masing-masing menyerang sambungan yang berbeda pada hemiselulosa. Dalam pretreatment glukoman, enzim  $\beta$ -mannanase, dan  $\beta$ -mannosidase memotong ikatan-ikatan polimer (Kumar dkk., 2008).



**Gambar 2.5.2 Model konversi hemiselulosa oleh enzim hemiselulase**

Pemutusan enzimatik dari ikatan-ikatan pada hemiselulosa terjadi melalui mekanisme hidrolisis asam atau air menurut persamaan reaksi



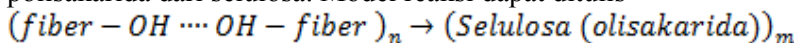
Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah dari golongan jamur dan bakteri. Adapun jenis jamur yang berpotensi menghasilkan enzim xilanase yaitu jamur *Trichoderma reesei*. *Trichoderma* adalah suatu jamur filamen yang secara luas berada di dalam tanah, tumbuh-tumbuhan yang membusuk, dan kayu.

### Enzim Selulase

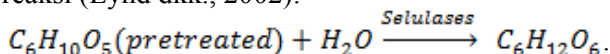
Beberapa enzim terlibat dalam pretreatment polimer yang menyusun bahan lignoselulosa. Polisakarida yang dominan adalah selulosa yang berbentuk Kristal rantai linear *1,4'-β-D-glucose* (Fessenden dkk., 1998). Pada jurnal-jurnal yang ditulis 5 tahun terakhir umumnya ditulis *β-(1,4)-D-glucan* (Buckeridge dkk., 2011).

Ada tiga tipe utama aktifitas enzimatik yang dirangkum dari beberapa jurnal oleh (Lynd, dkk., 2002) yaitu, (i) *endoglucanases* atau *1,4-β-d-glucan-4-glucanohydrolases* (EC 3.2.1.4), (ii) *exoglucanases*, termasuk *1,4-β-d-glucan glucanohydrolases* (yang juga dikenal sebagai *cellodextrinases*) (EC 3.2.1.74) dan *1,4-β-d-glucan cellobiohydrolases*

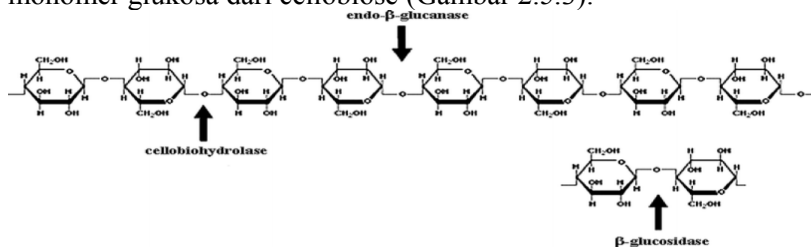
(*cellobiohydrolases*) (EC 3.2.1.91), dan (iii)  $\beta$ -glucosidases atau  $\beta$ -glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21). Fungsi dari endoglucanases adalah memotong sambungan ikatan hidrogen secara random dan bentuk amorphous internal pada rantai polisakarida dari selulosa. Model reaksi dapat ditulis



dimana (selulosa)<sub>m</sub> disebut juga oligosakarida dengan panjang rantai berbeda-beda. Exoglucanases bertindak untuk mereduksi rantai polisakarida selulosa yang dapat juga melepaskan glukosa (*glucanohydrolases*) atau cellobiose (*cellobiohydrolase*) sebagai produk utama. Exoglucanases juga dapat menyerang pada selulosa kristalin dengan cara kira-kira mengupas rantai-rantai selulosa dari struktur kristalin. Sedangkan enzim  $\beta$ -Glucosidases berfungsi untuk menghidrolisis cellobiose menjadi glukosa. Pemutusan enzimatik dari ikatan  $\beta$ -1,4-glucosidic pada selulosa terjadi melalui mekanisme hidrolisis asam atau air menurut persamaan reaksi (Lynd dkk., 2002):



Model lain yang lebih sederhana dalam proses hidrolisis bahan selulosa menjadi gula diusulkan juga oleh (Kumar dkk., 2008). Model yang penulis usulkan bahwa enzim endoglucanases menyerang secara acak ikatan internal dari rantai selulosa. Enzim *cellobiohydrolases* menyerang ujung-ujung rantai melepaskan cellobiose. Sementara enzim  $\beta$ -glucosidases adalah hanya aktif pada cello-oligosakarida dan cellobiose membebaskan monomer-monomer glukosa dari cellobiose (Gambar 2.5.3).



**Gambar 2.5.3 Model kerja enzim selulase (Kumar dkk., 2008)**  
**II.6 Penelitian Terdahulu**



Berikut ini merupakan hasil penelitian terdahulu yang menggunakan metode *pretreatment* dengan *subcritical water*.

No.	Jurnal	Ringkasan
1.	<b>Prado et al, 2014</b> Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water	Bahan baku : sabut kelapa, biji anggur dan serat kelapa sawit. Mereka menggunakan air subkritis dengan gas penekan uap air pada suhu 208°C dan 257°C selama 30 menit dengan tekanan 20 MPa. Hasil total gula setelah hidrolisis dengan air subkritis sebagai berikut: untuk sabut kelapa, pada suhu 208°C: 10,58 gr gula / 100 gr sabut kelapa; pada suhu 257°C: 10,42 gr gula / 100 gr sabut kelapa. Untuk biji anggur, pada suhu 208°C: 2,06 gr gula / 100 gr biji anggur; pada suhu 257°C: 2,15 gr gula / 100 gr biji anggur. Untuk serat kelapa sawit, pada suhu 208°C: 3,28 gr gula / 100 gr serat kelapa sawit; pada suhu 257°C: 8,1 gr gula / 100 gr serat kelapa sawit. Hasil sampling (inhibitor) setelah hidrolisis dengan air subkritis yaitu berupa furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 4-hydroxybenzoic acid dan vanilin dengan total 9,27 gr inhibitor / 100 gr sabut kelapa (suhu 208°C), 26,07 gr inhibitor / 100 gr sabut kelapa (suhu 257°C), 0,90 gr inhibitor / 100 gr biji anggur (suhu 208°C), 1,44 gr inhibitor / 100 gr biji anggur (suhu 257°C), 1,80 gr inhibitor / 100 gr serat kelapa sawit (suhu 208°C), 5,22 gr inhibitor / 100 gr serat kelapa sawit (suhu 257°C)
2.	<b>Zhang &amp; Wu,</b>	Bahan baku ; <i>baggase</i> tebu.

	<b>2013</b> Subcritical CO <sub>2</sub> pretreatment of sugarcane bagasse and its enzymatic hydrolysis for sugar production	<i>Pretreatment</i> menggunakan CO <sub>2</sub> subkritis dan selanjutnya dilakukan hidrolisis enzimatik. Kondisi operasi bervariasi yaitu pada 0-7 MPa (interval 2 MPa), pada suhu 140-180°C (interval 10°C) dalam waktu 20-100 menit (interval 20 menit). Hasil tertinggi yang didapatkan yaitu pada kondisi 5 MPa, lama <i>pretreatment</i> 60 menit dan suhu 160°C dengan total xilosa sebesar 14,91±1,10 gr / 100 gr <i>bagasse</i> tebu. Sedangkan total glukosa tertinggi setelah <i>pretreatment</i> yaitu 0,78±0,05 gr glukosa / 100 gr <i>bagasse</i> tebu dan didapatkan pada kondisi operasi dengan tekanan 5 MPa, lama <i>pretreatment</i> 100 menit dan suhu 180°C. Sedangkan untuk proses hidrolisis enzimatik, glukosa tertinggi yaitu 37,99±0,17 gr glukosa / 100 gr <i>bagasse</i> tebu didapatkan pada raw material yang telah dipretreatment pada kondisi 5 MPa, lama <i>pretreatment</i> 100 menit dan suhu 180°C.
<b>3</b>	<b>Prado, et al (2014)</b> _ Hydrolysis of sugarcane bagasse in subcritical water	Bahan baku yang digunakan adalah bagas tebu. Kondisi operasi pada T=200-290°C dan P= 20 Mpa. Eksperimen dilakukan menggunakan Semi batch reactor selama 30 menit. Gas penekan untuk air subkritis yaitu Uap air dengan Flowrate : 11, 22, 33, 44 and 55 mL/min. Yield monosakarida 5,6% (5,6 gram monosakarida/100gram <i>bagasse</i> ). yield total gula 23% (23 gram gula reduksi/100 gram <i>bagasse</i> )



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **III.1 Variabel penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Tekanan Nitrogen yang disuplai ke reaktor: 20 bar, 30 bar, dan 40 bar.
- Temperatur reaktor subkritis untuk setiap tekanan:  
P = 20 bar → 110°C; 130°C; 150°C; 170°C  
P = 30 bar → 10°C; 130°C; 150°C; 170°C  
P = 40 bar → 10°C; 130°C; 150°C; 170°C

#### **III.2 Bahan dan Alat**

##### **III.2.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:

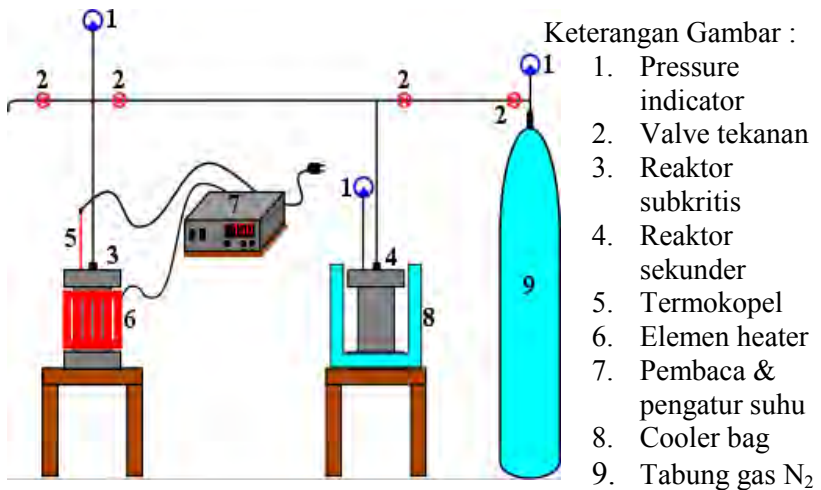
1. Sabut kelapa yang diperoleh dari Sulawesi Utara
2. Air murni (kemurnian 99,9%)
3. Natrium sitrat
4. Asam nitrat
5. Enzym selulase(Sigma-Aldrich, AS)
6. Buffer sitrat (Brataco, Indonesia)
7. DNS (*dinitrosalicylic acid*)(Sigma-Aldrich, Jerman)
8. CMC (*carboxymetil cellulose*)(Sigma-Aldrich, Jerman)
9. Nitrogen (kemurnian 99,9%)
10. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

##### **III.2.2 Alat Penelitian**

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Hot plate dan stirrer (Cimarec, USA),
2. *Spectrophotometer* (Cecil CE 1011, Inggris),
3. *Analytical balance* (Ohaus, Cina),
4. *Incubator Shaker*(Carbolite, Inggris),
5. Kondensor refluks(Schott, Jerman),
6. Tabung reaksi (Pyrex Iwaki, Indonesia),
7. Gelas ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia),
8. corong kaca(Herma, Jerman),

9. pipet volumetric (Pyrex Iwaki, Indonesia),
10. Pipet ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia),
11. pipet tetes,
12. gelas beker (Schott Duran, Jerman),
13. Labu ukur (Silber Brand, Jerman),
14. Erlemeyer (Pyrex Iwaki, Indonesia),
15. Oven (VWR S/P 1350 G-2,Amerika),
16. *Vortex*(VM-300, Taiwan),
17. Karet penghisap,
18. Spatula,
19. Vacuum Pump (Welch, AS),
20. Rak kayu,
21. Kuvet,
22. Kertas saring Whattman.
23. Reaktor seperti pada Gambar 3.2.1 memperlihatkan skema peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini. Desain dari peralatan ini diadaptasi dari laporan yang telah dilakukan pada riset sebelumnya (Ju dkk., 2011). Peralatan subkritis air rencana akan di konstruksi sendiri dengan menggunakan komponen Swagelok. Alat ini terdiri atas tabung nitrogen bertekanan tinggi, pemanas, pengontrol temperatur (PID), valve pengatur tekanan, valve otomatis (*safety valve*), batang magnet pengaduk, reaktor subkritis, pengukur tekanan dan termokopel. Reaktor batch akan dikonstruksi dengan volume 500mL. Pada prinsipnya ada tiga bagian dasar dari peralatan ini, yaitu reaktor subkritis, pemanas, dan devais pengontrol, dan reaktor akan dibuat dari bahan stainless steel. *Termocouple* dan sensor tekanan dihubungkan dengan reaktor dan terkait dengan alat pengontrol. Proses akan dijalankan dalam cara batch dan ditekan dengan nitrogen (kemurnian 99,9%).



**Gambar 3.2.1 Desain peralatan air subkritis yang digunakan dalam studi ini.**

### III.3 Prosedur Eksperimen

Prosedur eksperimen dan analisis mengikuti dan diadaptasi pada riset sebelumnya yang telah dilaporkan sebelumnya (Ju dkk., 2011).

1. Massa 6 gram lignoselulosa kering dicampur dengan 120 mL air murni.
2. Nitrogen disuplai ke reaktor dengan tekanan: 20, 30, dan 40 bar. Untuk masing-masing tekanan campuran dipanaskan dalam reaktor subkritis pada temperatur 110, 130, 150, dan 170°C untuk tekanan 20 bar. Sedangkan untuk tekanan 30 bar, temperturnya: 110, 130, 150, dan 170°C. Dan untuk tekanan 40 bar yaitu: 110, 130, 150, dan 170 °C. Data yang akan diperoleh adalah yield gula sebagai fungsi temperatur pada kondisi isobar, masing-masing, 20, 30, dan 40 bar dengan waktu reaksi 1 jam.
3. Setelah reaksi selesai, reaktor didinginkan sampai 30 °C dan diturunkan tekanan dengan membuka valve otomatis

untuk mengeluarkan nitrogen. Campuran terdiri dari padatan dan larutan.

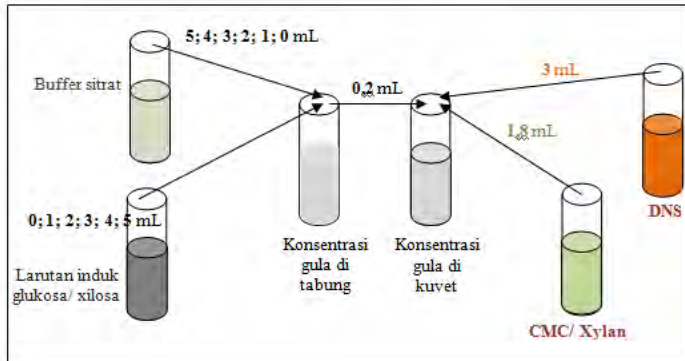
4. Padatan dipisahkan dengan menyaring dengan kertas saring kemudian dikeringkan selama 2 hari pada 60°C, sedangkan larutan ditambahkan air murni 400mL
5. Bagian padatan akan dilanjutkan dengan analisis XRD untuk mempelajari struktur kristal dari padatan.

### **III.4 Prosedur Pengukuran**

#### **III.4.1 Pengukuran Gula DNS**

1. Massa 1 gr dari padatan enzim murni selulase dilarutkan dengan buffer sitrat 0,1 M pH 3 dalam labu ukur sampai volume 100 ml
2. Dilakukan pengukuran efektivitasnya. Adapun tahapan pengukuran aktifitas suatu enzim dan pengukuran konsentrasi gula, metode DNS(*dinitrosalicylic acid*) mengikuti prosedur dari (Miller dkk., 1959). Prosedur adalah sebagai berikut:
  - Prosedur pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulase. Massa 0,367 gram dari glukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian dicampur dengan 100 ml buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 dalam labu. Larutan induk glukosa diencerkan lagi pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) menggunakan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5. Memasukkan 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar glukosa dan menambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi. Campuran diinkubasi pada temperatur 35°C selama 10 menit dan 3 ml DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Campuran dihomogenkan dengan cara memvortex campuran pada frekuensi tertentu. Tahap akhir adalah campuran

dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit untuk menghentikan reaksi.



**Gambar 3.4.1 Proses pembuatan kurva standar glukosa**

Langkah berikutnya adalah menurunkan temperature dengan menggunakan es selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 540 nm yang merupakan panjang gelombang / frekuensi foton yang dapat meresonansi molekul gula dan kurva kalibrasi dikonstruksi dengan mengplot molaritas glukosa terhadap absorbansi.

### III.4.2 Pengukuran Padatan XRD

Analisis sampel lignoselulosa menggunakan XRD (*X-Ray diffraction*). Pengukuran ini akan digunakan untuk menganalisis struktur dari sampel yang dilakukan pretreatment dan yang tidak dilakukan pretreatment. Kurva dari XRD untuk selulosa I mempunyai puncak yang kuat di  $14.26^\circ$ ,  $16.77^\circ$  dan  $22.58^\circ$  yang berhubungan dengan puncak Kristal (110), dan (002). Setelah dilakukan pretreatment, pola XRD berubah menjadi selulosa II yaitu terjadi penurunan cristalinitas di mana puncak-puncak terjadi di  $2\theta = 12,5^\circ$  dan  $20,0^\circ$  (Zhao dkk., 2012). Untuk menghitung *crystalline index* (CI) yaitu, rasio antara intensitas ( $I_{002} - I_{AM}$ ) dan intensitas  $I_{002}$ ,  $(I_{002} - I_{AM}) / I_{002}$ , setelah dilakukan pengurangan dengan *background signal* tanpa sampel. Posisi



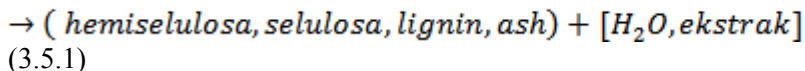
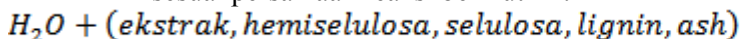
intensitas minimum terletak di antara puncak (002) dan (101) ( $I_{AM}$ , kira-kira di  $18,3^\circ$ ), sedangkan puncak dari amorphous berlokasi di sekitar  $20,7^\circ$ , sementara xilan (murni) di  $19,5^\circ$  (Zhu dkk., 2012; Zhao dkk., 2012; and Park dkk., 2010).

### III.5 Hidrolisis Padatan

#### III.5.1 Analisis komposisi kimia lignoselulosa

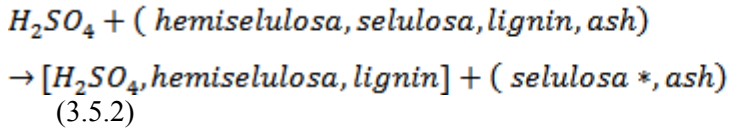
Analisis komposisi kimia dari lignoselulosa dilakukan mengikuti referensi dari Datta (1981) dengan tahapan sebagai berikut:

1. Bahan lignoselulosa kering *bermassa a* dilarutkan dengan air 150 mL selama 1-2 jam pada kolom destilasi refluks. Pada proses ini akan dikeluarkan material-material ekstrak, seperti air, asam, gula, etanol, phenol dan lain-lain. Proses ini akan mengeluarkan semua ekstrak dan terlarut dalam air sesuai persamaan reaksi berikut ini:

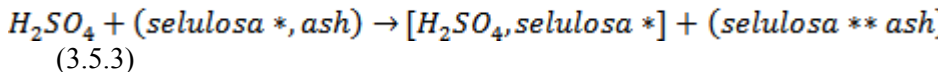


2. Residu disaring dengan kertas saring *Whatman Cat No 1440 125 GE Healthcare UK*.
3. Residu dicuci dengan air panas 300 mL untuk mengeluarkan sisa-sisa ekstrak.
4. Residu dikeringkan dengan oven (*VWR 1350 G*) pada temperatur  $60^\circ\text{C}$  sampai beratnya konstan dan kemudian ditimbang, dengan *massa b*.
5. Padatan ditambahkan 150 ml  $H_2SO_4$  1 N.
6. Campuran dipanaskan dalam labu selama 1 jam pada suhu  $100^\circ\text{C}$  di mana labu dilengkapi dengan waterbath dan dihubungkan dengan kolom refluks. Pada tahap ini, larutan  $H_2SO_4$  melarutkan hemiselulosa yang mempunyai struktur agak amorf

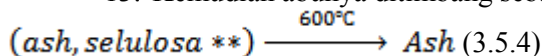
sedangkan selulosa berubah orientasinya menjadi amorf yang digambarkan reaksi sebagai berikut:



7. Residu yang diperoleh dicuci dengan air dan disaring sampai pH air mendekati 7 atau netral.
8. Laludilakukan pengeringan sampai massanya konstan, *massa c*.
9. Residu kering *massa c* ditambahkan 10 ml  $H_2SO_4$  72% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 4 jam.
10. Laluditambahkan lagi 150 ml 1N  $H_2SO_4$  dan direfluks pada temperatur  $100^\circ C$  selama 1 jam dilengkapi dengan wáterbath, kolom refluks dan kondenser. Pada proses ini,  $H_2SO_4$  akan melarutkan selulosa yang pada proses sebelumnya telah menjadi amorf:



11. Hasil dari padatan dicuci dengan air dan disaring kemudian dipanaskan pada temperatur  $60^\circ C$  sampai massanya konstan sebagai *massa d*.
12. Tahap selanjutnya residu dipanaskan sampai  $600^\circ C$  pada tungku (*Furnace Linn high therm VMK 135 Germany*) selama 3-4 jam.
13. Kemudian abunya ditimbang sebagai *massa e*.



Perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa dan kadar lignin menggunakan rumus berikut ini :

$$\text{Kadar selulosa} = \left[ \frac{c-d}{a} \right] \times 100\%$$

Kadar hemiselulosa =  $\left[ \frac{b-c}{a} \right] \times 100\%$

Kadar lignin =  $\left[ \frac{d-e}{a} \right] \times 100\%$ .

### III.5.2 Uji aktifitas enzim

#### Prosedur pembuatan untuk larutan blanko :

1. Volume 2 ml buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
2. Lalu, 3 ml DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi serta campuran dipanaskan pada 100°C selama 10 menit.
3. Campuran didinginkan pada temperature 0°C selama 10 menit.
4. dilanjutkan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm.

#### Prosedur uji aktifitas enzim selulase dan xilanase sebelum di koreksi :

1. Volume 0,2 ml enzim selulase/xilanase dari *A. Niger* dan *T.reesei* dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur dengan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*)/xilan
2. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
3. Senyawa 3 ml DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi.
4. campuran divortex serta dipanaskan pada 100°C dengan maksud menghentikan reaksi.
5. Campuran didinginkan sampai 0°C selama 10 menit dan kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm.

#### Prosedur uji aktifitas enzim selulase/xilanase untuk larutan koreksi :

Prosedur pada tahap ini adalah mirip dengan prosedur pada poin sebelumnya. Perbedaan adalah pada tahap ini senyawa DNS dicampur terlebih dulu dengan 2 ml enzim selulase/xilanase

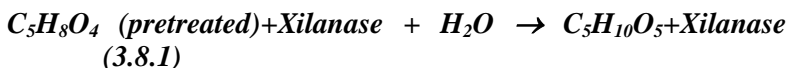
dari *A. Niger* dan *T. Reesei* dan dipanaskan pada 100°C kemudian 1,8 mL CMC/xilan ditambahkan kecampuran. Tahapan selanjutnya sama dengan tahapan pada poin sebelumnya.

### **Hidrolisis dengan enzim selulase *Aspergillus niger***

Pada tahap hidrolisa glukosa dan xilosa ini menggunakan enzim murni. Tahap persiapan enzim selulase *Aspergillus niger*:

1. Massa 1 gr padatan dari enzim murni dilarutkan dengan buffer sitrat 0,1 M pH 3 dalam labu ukur sampai volume 100 ml.
2. Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa mengikuti prosedur sebagai berikut:
  - (a) Massa 1 gram lignoselulosa(100-120 mesh) yang sudah di *pretreatment* secara kimiawi (*didelignifikasi*) dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml.
  - (b) Kemudian dicampur dengan enzim selulase dari *A. niger* dengan aktifitasnya 93 U.
  - (c) Buffer sitrat 0,1 M pH 3 ditambahkan ke dalam larutan enzim dan lignoselulosasampai 30 ml.
  - (d) Tingkat keasaman, pH, dari larutan dikontrol sampai 3 dengan menambahkan natrium sitrat atau asam sitrat.
  - (e) Larutan dipanaskan sambil diaduk dalam *IncubatorShaker* dengan suhu di jaga konstan 60 °C
  - (f) Konsentrasi glukosa dalam hidrolisat dianalisis dengan metode DNS dan setiap selang waktu 0;2;4;6;9;12; dan 24 jam.

Mekanisme reaksi kimia pada hidrolisis enzimatik dari selulosa dan hemiselulosa menjadi gula dapat ditulis sebagai berikut.





Prosedur pembuatan buffer sitrat 0,1 M pH 3 yaitu:

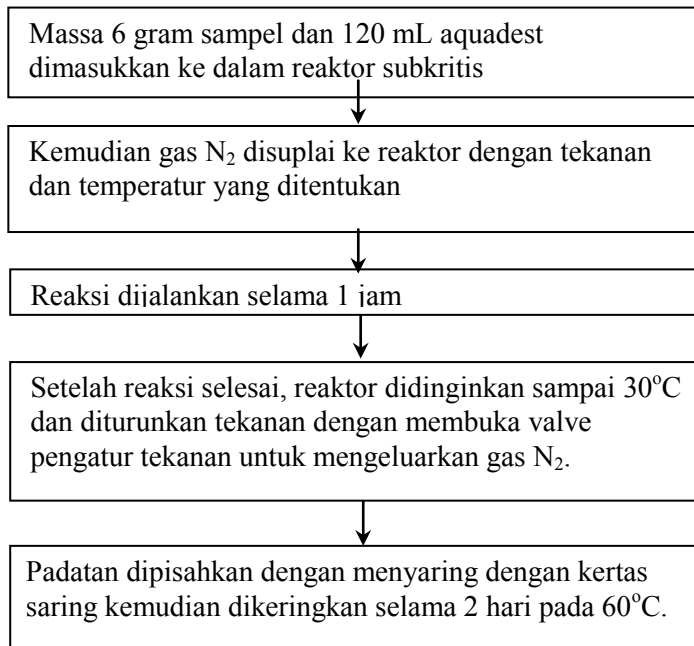
1. massa 17,87 gram asam sitrat dicampur dengan 2,06 gram sodium sitrat
2. Kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga 1000 mL.
3. Tingkat keasaman, pH, dari larutan buffer diset dengan menambah NaOH 0,1 M atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 3.

Prosedur analisa kadar glukosa yaitu:

1. volume 0,2 ml sampel setiap selang waktu tertentu ditambahkan ke 1,8 ml aquades dan ditambahkan 3 ml larutan DNS.
2. Campuran dipanaskan pada air 100°C selama 10 menit.
3. Campuran didinginkan dengan air es selama 10 menit.
4. Kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm.

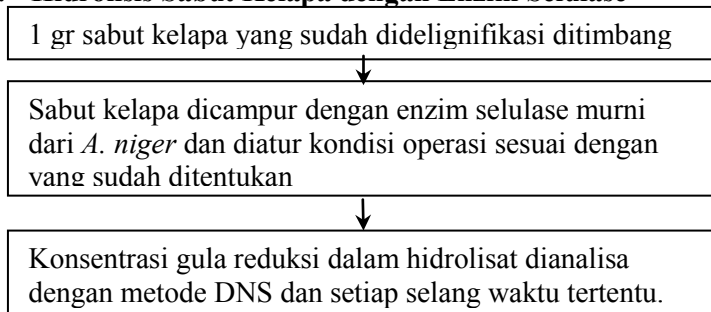
### III.6 Diagram Alir Percobaan

#### III.6.1 Pretreatment Sabut Kelapa Menggunakan Air Subkritis



#### III.6.2 Hidrolisis Sabut Kelapa

##### 1. Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase



## **2. Analisa Kadar Gula Reduksi**

0,2 ml sampel diambil setiap selang waktu tertentu yang telah disentrifugasi ditambahkan 1,8 ml aquadest kedalam tabung reaksi.



Ditambah 3 ml larutan DNS dan dipanaskan di air mendidih selama 10 menit.



Didinginkan di air es selama 10 menit dan diukur absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm.

### **III.7. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Penelitian dilakukan selama bulan Januari 2015 sampai Juli 2015.

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan gula reduksi dari sabut kelapa melalui proses *pretreatment* bahan baku dan hidrolisis secara enzimatik. Dalam penelitian untuk menghasilkan gula reduksi, terdapat beberapa tahapan proses yang harus dilakukan yaitu:

1. Tahap *pretreatment* sabut kelapa dengan menggunakan reaktor.
2. Tahap penyiapan larutan enzim selulase murni dari *Aspergillus niger*.
3. Tahap hidrolisis enzimatik sabut kelapa dengan enzim selulase.

#### **IV.1 Pretreatment Sabut Kelapa**

Proses *pretreatment* sabut kelapa pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan cara mekanik, dan menggunakan reaktor subkritis. Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi monomer gula.

##### **IV.1.1 Pretreatment Mekanik**

Dalam proses *pretreatment* mekanik, hal yang pertama yang harus dilakukan yaitu mengeringkan sabut kelapa dibawah sinar matahari secara langsung. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya pembusukan pada sabut kelapa sehingga dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama. Sabut kelapa yang telah kering selanjutnya digiling dengan mesin penggiling. Kemudian untuk menghilangkan kandungan air maka sabut kelapa dimasukkan dalam oven pada suhu 60 °C. Dengan menghilangkan air dari sabut kelapa dengan cara menguapkan air tersebut menggunakan energi panas maka dapat menghambat



pertumbuhan mikroba pada sabut kelapa yang digunakan (Underwood, 2002).

Dalam penelitian sebelumnya ukuran optimum untuk proses degradasi jerami padi diperoleh pada ukuran 100-120 mesh (Anwar dkk, 2011). Oleh sebab itu dilakukan pengayakan untuk memperoleh ukuran optimum yaitu 100-120 mesh. Hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga memudahkan mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa.

#### **IV.1.2 Pretreatment dengan Metode Subkritis**

*Pretreatment* sabut kelapa dengan reaktor subkritis bertujuan untuk menghilangkan kadar lignin karena struktur lignin pada sabut kelapa bersifat kokoh sehingga dapat menghalangi kinerja enzim dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. Dengan rusaknya struktur lignin, selulosa dan hemiselulosa yang terkandung dalam lignoselulosa akan lebih mudah diakses oleh enzim sehingga proses hidrolisinya akan berjalan lebih mudah, sehingga akan dihasilkan gula reduksi yang lebih besar jumlahnya (Asgher, 2013).

##### **IV.1.2.1 Pretreatment Sabut Kelapa dengan Reaktor Subkritis**

Dalam *pretreatment* ini, larutan yang digunakan adalah larutan aquadest. 6 gram sabut kelapa yang telah mengalami proses *pretreatment* mekanik sehingga memiliki ukuran 100-120 mesh, dilarutkan dalam 120 mL aquadest, lalu dimasukkan ke dalam reaktor subkritis dengan temperatur dan tekanan sesuai dengan variabel, operasi dengan reaktor ini dilakukan selama 1 jam. Setelah proses *pretreatment* selesai, sabut kelapa disaring dengan kertas saring dan selanjutnya dikeringkan dengan oven. Liquid hasil reaksi di dalam reaktor disimpan di lemari pendingin. Massa akhir sabut kelapa setelah *pretreatment* ditunjukkan pada Tabel IV.1:

**Tabel IV.1 Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah  
*Pretreatment* dengan Reaktor Subkritis**

Variabel	Tekanan (bar)	Suhu (°C)	Massa sabut kelapa (gram)		Massa yang Hilang (gram)
			Masuk Reaktor	Keluar reaktor	
I	20	110	6	4,61	1,39
II	30	110	6	4,54	1,46
III	40	110	6	4,31	1,69
IV	20	130	6	4,68	1,32
V	30	130	6	4,74	1,26
VI	40	130	6	4,6	1,4
VII	20	150	6	4,14	1,86
VIII	30	150	6	4,94	1,06
IX	40	150	6	4,23	1,77
X	20	170	6	4,02	1,98
XI	30	170	6	4,05	1,95
XII	40	170	6	4,03	1,97

Pada Tabel IV.1 menunjukkan massa sabut kelapa yang tereduksi setelah dilakukan *pretreatment* dengan reaktor subkritis. Massa yang hilang setelah *pretreatment* bervariasi yaitu dari 1,05 gram sampai dengan 1,98 gram. Hal ini dikarenakan pada *pretreatment* dengan reaktor subkritis, sebagian selulosadanhemiselulosa yang terkandung dalam sabut kelapa sudah terkonversi menjadi gula reduksi. (Prado, dkk, 2014)

Selulosa dan Hemiselulosa dari sabut kelapa yang terkonversi menjadi gula reduksi setelah proses *Pretreatment* dengan reaktor subkritis ditunjukkan pada Tabel IV.2:

**Tabel IV.2 Selulosa dan Hemiselulosa yang Terkonversi Menjadi Gula Reduksi Setelah *Pretreatment* dengan Reaktor Subkritis**

NO	Tekanan (bar)	Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi Gula Reduksi (g/L)
I	20	110	0,1	0,06
II	20	130	0,2	0,13
III	20	150	0,28	0,18
IV	20	170	0,31	0,19
V	30	110	0,12	0,08
VI	30	130	0,23	0,14
VII	30	150	0,32	0,2
VIII	30	170	0,3	0,19
IX	40	110	0,12	0,08
X	40	130	0,19	0,12
XI	40	150	0,31	0,19
XII	40	170	0,48	0,3

Hasil konsentrasi gula reduksi yang didapatkan pada tabel diatas diperoleh dengan melakukan uji DNS (*Dinitrosalicylic acid*) pada *liquid* hasil *pretreatment* dengan reaktor subkritis. Hasilnya didapatkan bahwa setelah *pretreatment* dengan menggunakan reaktor subkritis, terdapat sejumlah selulosa dan hemiselulosa yang terkonversi menjadi gula reduksi. Hal ini dikarenakan air pada tekanan dan temperatur yang tinggi dapat berperan sebagai solven dan dapat menguraikan substrat yang berupa *biomass* menjadi komponen penyusunnya, yaitu: xilosa, glukosa, galaktosa, manosa, rhamnosa, dan *uronic acid* (Ju dkk., 2011).

Selain itu, berkurangnya massa solid hasil *pretreatment* dengan reaktor subkritis disebabkan juga karena terjadinya pemecahan ikatan lignin yang terkandung dalam sabut kelapa. Sehingga, lignin yang terpecah terlarut dalam air. Lignin yang terlarut dalam air menyebabkan warna air menjadi hitam. *Liquid* berwarna hitam tersebut biasanya disebut *black liquor*, yaitu

larutan yang merupakan residu dari lignin (Jing Jing, dkk 2011). Sehingga, salah satu penyebab hilangnya massa pada sabut kelapa hasil *pretreatment* dengan menggunakan reaktor subkritis adalah lignin yang terlarut dalam air.



**Gambar IV.1 *Liquid* hasil *pretreatment* dengan reaktor subkritis**

#### **IV.1.2.2 Perbandingan Komposisi Kimia Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah *Pretreatment* dengan Metode Subkritis.**

Metode penentuan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin, mengikuti metode telah diusulkan oleh Datta dan Rathin (1981). Dari Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa konsentrasi yang ditunjukkan dalam presentase berat (%w/w) sebelum hidrolisis selulosa 21,92%, hemiselulosa 18,63%, dan lignin 48,42%. Perolehan ini sedikit berbeda dengan yang dilaporkan dengan penelitian sebelumnya khususnya komponen lignin sebesar 47%, hemiselulosa sebesar 10%, dan selulosa sebesar 22% (Bilba, dkk 2007). Perbedaan kadar komponen ini dipengaruhi oleh jenis, asal, kematangan dan *pretreatment* mekanik dari bahan baku yang digunakan (Dam dkk., 2006).

**Tabel IV.3 Prosentase Komposisi Kimia Sabut Kelapa  
Sebelum dan Sesudah *Pretreatment* Air Subkritis**

Variabel	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
<i>Unpretreatment</i>	21,92%	18,63%	48,42%
IX	27,31%	13,14%	45,28%
II	23,14%	11,94%	53,55%
VI	24,38%	13,82%	52,46%
XI	27,66%	4,51%	54,42%

Dari Tabel IV.3 dapat diketahui bahwa konsentrasi selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami perubahan dari sebelum *pretreatment* dengan sesudah dilakukan *pretreatment* dengan menggunakan reaktor subkritis, dimana konsentrasi ini ditunjukkan dalam prosentase berat (%w/w).

Dari hasil analisa menggunakan metode yang dikembangkan Datta dan Rathin (1981) tersebut, prosentase kandungan lignin dalam sabut kelapa yang telah *dipretreatment* cenderung meningkat. Hal ini disebabkan karena, sebagian besar hemiselulosa terkonversi menjadi gula reduksi. Sehingga prosentase dari lignin mengalami peningkatan. Akan tetapi, massa lignin dalam sabut kelapa yang telah *dipretreatment* mengalami penurunan dibandingkan dengan massa lignin dalam sabut kelapa sebelum *dipretreatment*.

#### **IV.1.2.3 Yield Gula Reduksi yang Dihidrolisis Secara Air Subkritis**

Untuk menghitung massa gula reduksi yang didapat setelah *pretreatment* dilakukan dengan cara mengalikan konsentrasi gula yang didapat (g/L) dengan volume aquadest yang dicampur (L). Ada dua jenis yield yang didapatkan yaitu yield per massa sabut kelapa total dan yield per massa selulosa ditambah massa hemiselulosa. Didapatkan hasil seperti yang ditunjukkan pada tabel IV.5 berikut ini

**Tabel IV.5 Hasil Massa Gula Reduksi dan Yield Setelah  
Pretreatment Air Subkritis**

NO	P (bar)	T (°C)	Massa Gula (gr)	% Yield I*	% Yield II**
I	20	110	0,0154	0,2565	0,6324
II	20	130	0,2051	3,4155	8,4209
III	20	150	0,3394	5,6490	13,9277
IV	20	170	0,3868	6,4408	15,8799
V	30	110	0,0480	0,8006	1,9740
VI	30	130	0,2427	4,0430	9,9682
VII	30	150	0,4140	6,8979	17,0069
VIII	30	170	0,3856	6,4204	15,8295
IX	40	110	0,0524	0,8723	2,1508
X	40	130	0,1873	3,1196	7,6913
XI	40	150	0,3930	6,5452	16,1373
XII	40	170	0,7102	11,8331	29,1746

*Keterangan : \* Yield I : gram gula/gram solid dikali  
100%*

*\*\*Yield II : gram gula/(gram  
selulosa+gram hemiselulosa) dikali  
100%*

Dari data diatas dapat dilihat bahwa massa gula dan kedua yield yang didapat cenderung meningkat sesuai dengan peningkatan suhu. Sedangkan tekanan tidak mempengaruhi perolehan massa gula reduksi dan kedua yield. Bisa dilihat pada suhu 110 °C, perolehan massa gula reduksi pada tekanan 20 bar, 30 bar, dan 40 bar fluktuatif. Hal ini disebabkan karena untuk memperoleh massa gula reduksi yang besar diperlukan suhu yang semakin besar untuk memecah selulosa menjadi gula monomer. (Mohan, dkk, 2015)

Dalam percobaan ini diambil sampel secara acak dari variabel yang ada yaitu no VI dan IX untuk diberi tambahan

perlakuan berbeda. Perlakuan berbeda yang dimaksud adalah ketika sampel yang dipanaskan mencapai suhu dan tekanan yang ditetapkan, langsung didinginkan tanpa diberi waktu satu jam yang dilambangkan dengan notasi 'B', sedangkan notasi 'A' adalah perlakuan dengan waktu satu jam setelah tercapai suhu dan tekanan yang ditentukan. Massa gula diukur dengan analisa DNS. Tujuan dari langkah ini adalah untuk mengetahui apakah sampel sudah mengalami reaksi sebelum mencapai suhu dan tekanan yang ditetapkan. Didapatkan hasil seperti yang ditunjukkan pada tabel IV.6 berikut ini

**Tabel IV.6 Perbandingan Perolehan Massa Gula Reduksi dan Yield dengan Perbedaan Perlakuan**

N O	P (bar)	T (°C)	Massa Gula (gr)		Waktu Pemanasan		Waktu Pendinginan	
			A*	B**	A	B	A	B
V I	30	130	0,43	0,23	1:13: 38	1:32: 41	0:27: 31	0:22: 42
I X	40	110	0,23	0,16	0:50: 37	0:58: 07	0:55: 52	0:36: 24

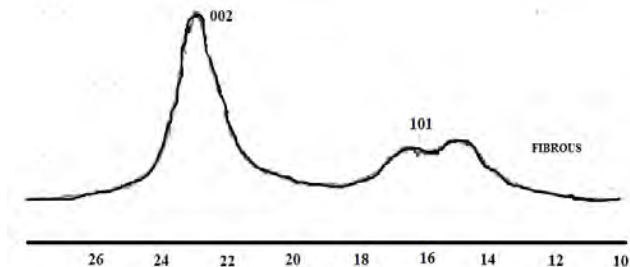
*Keterangan : \*A = Setelah mencapai suhu dan tekanan yang ditentukan diberi waktu 1 jam*

*\*\*B = Setelah mencapai suhu dan tekanan yang ditentukan langsung didinginkan*

Pada tabel IV.6 menunjukkan berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk pemanasan dan pendinginan serta massa gula reduksi yang diperoleh untuk masing-masing perlakuan. Dapat dilihat bahwa sudah terbentuk gula reduksi pada perlakuan B meskipun nilainya lebih kecil daripada perlakuan A. Berdasarkan data diatas, sebelum sampel mencapai suhu dan tekanan yang ditentukan, sudah terjadi hidrolisis sehingga terbentuk gula reduksi.

#### IV.1.2.4 Analisa X-Ray Diffraction

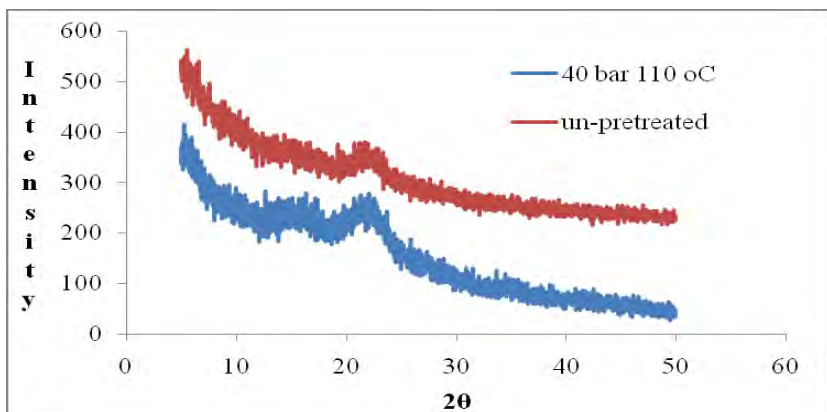
Metoda XRD digunakan untuk menentukan nilai *Crystallinity Index* suatu bahan lignoselulosa. Metode ini adalah metode paling sederhana yang digunakan untuk mengukur *Crystallinity Index*. XRD membaca nilai CrI dari jumlah relatif kristal selulosa dalam total solid. Komponen lignin dan hemiselulosa adalah berbentuk amorfous, jika dihilangkan dari bahan lignoselulosa akan menyebabkan naiknya *Index Crystallinity* (CrI). *Crystallinity Index* (CrI) diperoleh dengan menggunakan pembacaan hasil XRD dengan menentukan intensitas selulosa *amorf* dan intensitas selulosa kristalin. Intensitas selulosa amorf muncul sudut  $2\theta$  didaerah sekitar  $18,5^\circ$  sedangkan untuk struktur selulosa kristalin dengan bidang I002 berada pada sudut sekitar  $22,4^\circ$ . (Mohan, dkk, 2015) (Park, dkk, 2010)



**Gambar IV.3 X-Ray difraktrogram untuk selulosa murni (Schroeder, dkk., 1985)**

Berdasarkan Gambar IV.3, untuk Fibrous selulosa, bidang 002, 101, dan 101 yang menunjukkan bidang untuk kristal selulosa tipe I terlihat sangat jelas dan pada grafiknya menunjukkan puncak-puncak yang sangat ketara. Hal ini menunjukkan bahwa tingginya jumlah selulosa kristalin tipe I didalamnya. (Schroeder, dkk., 1985)





**Gambar IV.4 Grafik Perbandingan Hasil Analisa *X-Ray Diffraction* untuk Sabut Kelapa yang Tidak *Dipretreatment* dan dengan yang Telah *Dipretreatment***

Perhitungan nilai Cr.I dari masing-masing sampel, diperoleh dengan menggunakan metode *surface area*, yaitu dengan membandingkan antara luas area kristalin dengan luas area total kristalin dan amorf (Paletto, dkk. 2012). Dari hasil analisa *X-Ray Diffraction* dapat diketahui bahwa kristalinitas dari sabut kelapa yang belum *dipretreatment* adalah 48,8 %. Sedangkan kristalinitas sabut kelapa yang sudah *dipretreatment*, yaitu dengan mengambil sampel variabel 40 bar 110°C adalah 39,91%. Dengan kata lain, kristalinitas dari sabut kelapa setelah *pretreatment* mengalami penurunan. Selulosa yang terkandung dalam sabut kelapa mengalami perubahan struktur menjadi lebih amorf. Hal ini disebabkan karena *pretreatment* air subkritis dapat menurunkan tingkat kristalinitas dari selulosa.

Selain dapat memecah ikatan lignin pada lignoselulosa, metode *pretreatment* air subkritis juga bisa mengurangi tingkat krsitalinitas selulosa. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji XRD (*X-Ray Diffraction*) yang menunjukkan menurunnya tingkat kristalinitas bahan setelah di-*pretreatment*. Sehingga, semakin tinggi tekanan dan suhu operasi reaktor subkritis saat proses *pretreatment*, maka tingkat kristalinitas juga akan semakin

menurun. Dengan kata lain, semakin tinggi tekanan dan suhu, struktur selulosa akan semakin amorf. Jika struktur selulosa amorf, maka akan semakin mudah bagi enzim selulase untuk mengubah selulosa menjadi gula reduksi. (Mohan., dkk, 2015)

#### IV. 2 Hidrolisis enzimatik sabut kelapa

Sebelum dilakukan Hidrolisis enzimatik sabut kelapa perlu dilakukan beberapa tahapan persiapan. Tahapan yang harus dilakukan yaitu:

1. Penyiapan dan pembuatan larutan enzim selulase murni
2. Hidrolisis enzimatik sabut kelapa dengan enzim selulase

##### IV.2.1 Penyiapan dan Pembuatan Larutan Enzim Selulase Murni

Untuk tahap Hidrolisis Enzimatik dalam penelitian ini menggunakan enzim selulase murni dari *Aspergillus Niger*. Cara mendapatkan aktifitas enzim selulase yaitu melalui kurva standar glukosa. Kurva ini digambarkan dengan melakukan *plotting* absorbansi, sebagai sumbu x dan konsentrasi glukosa sebagai sumbu y. Dari kedua data tersebut dibuat kurva kalibrasi, sehingga didapatkan kurva standar glukosa yang digunakan untuk menguji keaktifan enzim selulase murni. Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 4.8

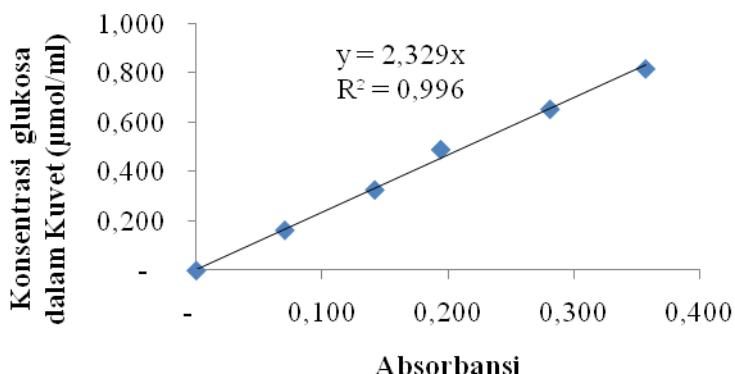
**Tabel IV.8 Perhitungan Kurva Standar Glukosa(dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase**

Larutan Induk Glukosa 0,02 M (ml)	Buffer Sitrat (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (μmol/ml)		Absorbansi
					Di tabung <sub>1)</sub>	Di kuvet <sub>2)</sub>	
0	5	0,2	1,8	5	0	0	0
1	4	0,2	1,8	5	4,08	0,16	0,07
2	3	0,2	1,8	5	8,16	0,33	0,14
3	2	0,2	1,8	5	12,23	0,49	0,19
4	1	0,2	1,8	5	16,31	0,65	0,28
5	0	0,2	1,8	5	20,39	0,82	0,36

<sup>1)</sup> $20,39 \times \text{Volume larutan glukosa} / \text{volume total}$

<sup>2)</sup>Konsentrasi ditabung  $\times 0,2/5$

Dari tabel IV.8 dapat dibuat kurva standar glukosa dimana absorbansi sebagai sumbu x dan konsentrasi glukosa (dalam  $\mu\text{mol/ml}$ ) sebagai sumbu y. Setelah itu ditarik suatu garis linier dan didapatkan persamaannya. Berikut adalah grafik kurva standar glukosa:



**Gambar IV.6 Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase**

Setelah kurva standar glukosa telah didapat, langkah selanjutnya adalah menguji keaktifan enzim. Keaktifan enzim diuji dengan metode DNS dan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva di atas (Gambar 4.6) diperoleh dari larutan glukosa yang dicampur dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC). Alasan penggunaan CMC adalah karena CMC dapat dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi glukosa. Berdasarkan hal ini, dapat diketahui berapa besar aktivitas enzim tersebut. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari enzim selulase adalah 540 nm. Karena pada panjang gelombang tersebut, reaksi gula reduksi dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan sehingga dapat terbaca absorbansinya oleh gelombang 540 nm.

### IV.2.1 Uji Aktifitas Larutan Enzim Selulase Murni

Satu Unit (1U) aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan satu  $\mu\text{mol}$  gula reduksi per menit. Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase murni dari *Aspergillus niger* ditunjukkan pada Tabel 4.9

**Tabel IV.9 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase**

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/mL)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
<i>Selulase</i>	1,14	0,91	0,23	2,33	1,36

**Keterangan** : A<sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi  
A<sub>2</sub> : Absorbansi larutan setelah koreksi  
Aktivitas enzim = (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) x slope kurva standar gula reduksi x 5 / (10 x 0,2)

Dari Tabel IV.9, dapat diperoleh aktifitas enzim selulase murni dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{- Aktifitas enzim selulase} &= (A_1 - A_2) \times \text{Slope kurva standar glukosa} \times 5 / (10 \times 0,2) \\ &= (1,14 - 0,91) \times 5 / (10 \times 0,2) \\ &= 1,36 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Dari hasil perhitungan aktivitas enzim tersebut, dapat dilakukan perhitungan untuk kebutuhan enzim untuk proses Hidrolisis enzimatik dalam penelitian ini.

### IV.2.2 Hidrolisis Enzimatik Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase

Dalam Hidrolisis enzimatik sabut kelapa ini perlu dipersiapkan kurva standar glukosa tanpa CMC yang berfungsi untuk mengukur konsentrasi glukosa pada saat proses Hidrolisis

enzimatis berlangsung. Dalam pembuatan kurva ini, *Carboxymetil Cellulose* (CMC) tidak digunakan, tetapi hanya menggunakan aquades. Hal ini dikarenakan CMC hanya diperlukan untuk mengetahui aktivitas enzim.

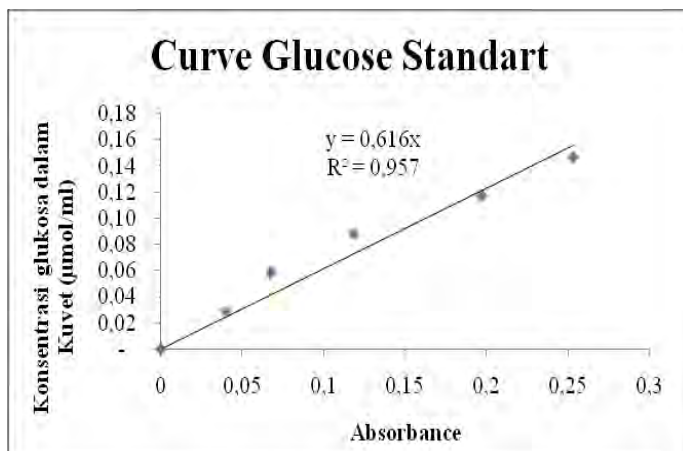
**Tabel IV.10 Perhitungan Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis enzimatis Sabut Kelapa**

Larutan Glukosa 0,02 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	Aquadest (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (gram/L)		Absorbansi
					Di tabung <sup>1</sup>	Di kuvet <sup>2</sup>	
0	5	0,2	1,8	5	0	0	0
1	4	0,2	1,8	5	0,74	0,03	0,04
2	3	0,2	1,8	5	1,47	0,06	0,07
3	2	0,2	1,8	5	2,21	0,09	0,12
4	1	0,2	1,8	5	2,94	0,12	0,2
5	0	0,2	1,8	5	3,68	0,15	0,25

<sup>1)</sup>  $3,68 \times \text{Volume larutan glukosa} / \text{volume total}$

<sup>2)</sup>  $\text{konsentrasi ditabung} \times 0,2 / 5$

Dari tabel IV.10 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara menggambarkan data glukosa dalam kuvet sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Setelah itu dengan menggunakan metode regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa (tanpa CMC) untuk pengujian gula reduksi hasil Hidrolisis enzimatis.



**Gambar IV.7 Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis enzimatis Sabut Kelapa**

Kondisi operasi dari proses Hidrolisis enzimatis adalah pada temperatur 60 °C, selama 24 jam. Suhu 60°C dijaga konstan dengan menggunakan *inkubator shaker*. Kondisi operasi ini ditetapkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa aktivitas enzim akan optimum pada suhu tinggi dengan pH rendah.

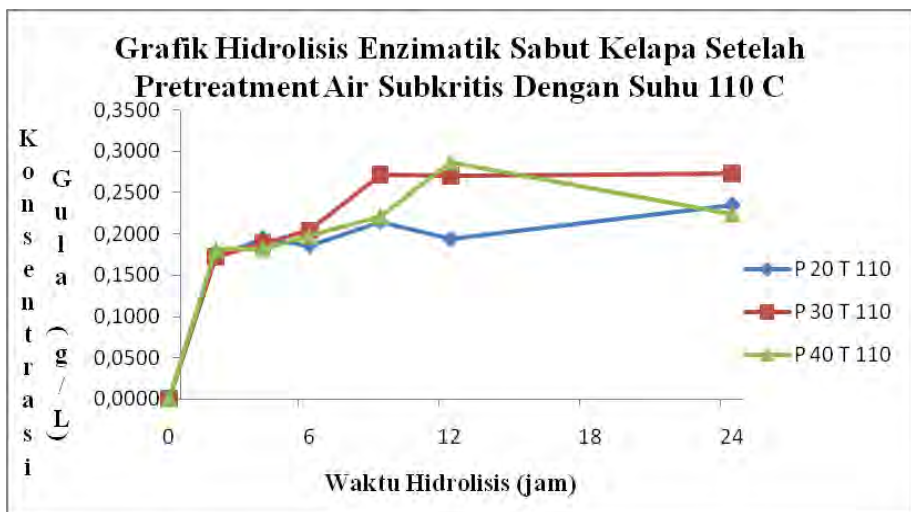
Proses analisa gula selama Hidrolisis enzimatis dilakukan pada selang waktu 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24 jam. Dalam selang waktu ini sample dari campuran Hidrolisis enzimatis diambil sekitar 2 ml, lalu dipanaskan didalam air mendidih selama 2 menit untuk mematikan enzim (Zhu dkk., 2012) dan tidak terjadi Hidrolisis enzimatis selama proses pengujian kadar gula. Setelah 2 menit pemanasan, larutan sampel ini dimasukan dalam *centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, penggunaan kondisi ini untuk memisahkan antara supernatan dan endapan secara maksimal. Kemudian 0,2 mL bagian liquid setiap sampel

hasil sentrifugasi diambil dan ditambahkan 1,8 mL aquades serta DNS sebanyak 3 mL, lalu larutan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Selanjutnya larutan tersebut dipanaskan di air mendidih selama 10 menit, selanjutnya didinginkan menggunakan air es selama 10 menit.

**Tabel IV.11 Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan Pretreatment Air Subkritis untuk Variabel I (20 bar), II (30 bar), dan III (40 bar) (Suhu 110°C)**

Jam ke-	Variabel					
	I		II		III	
	(20 bar)		(30 bar)		(40 bar)	
	A	C dalam tabung (g/L)*	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)
0	0	0	0	0	0	0
2	0,28	4,31	0,27	4,29	0,29	4,53
4	0,31	4,87	0,30	4,71	0,29	4,56
6	0,30	4,65	0,33	5,10	0,31	4,94
9	0,34	5,38	0,43	6,78	0,35	5,53
12	0,31	4,84	0,43	6,75	0,46	7,18
24	0,37	5,88	0,43	4,20	0,36	5,60

\*Hasil dari slope x absorbansi x 5 / 0,2



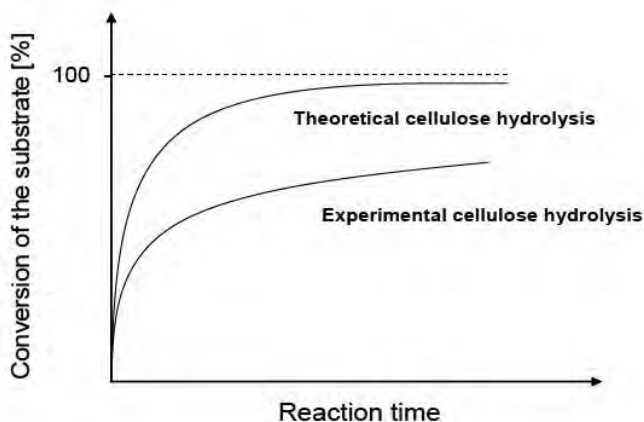
**Gambar IV.8 Perbandingan Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa Variabel I (20 bar), II (30 bar) dan III (40 bar) (Suhu 110°C)**

Dari Tabel IV.12 dan Gambar IV.8 didapatkan bahwa pada tiap kondisi *pretreatment* air subkritis, terjadi fluktuasi konsentrasi gula seiring berjalannya lama Hidrolisis enzimatik. Pada kondisi *pretreatment* tekanan 20 bar dan suhu 110°C, konsentrasi gula hasil Hidrolisis enzimatik cenderung fluktuatif seiring berjalannya waktu namun apabila dilihat secara seksama, kadar gulanya cenderung stabil pada jam ke 9 hingga jam ke 24 sekalipun tampak sedikit fluktuatif. Pada jam ke 2 hingga jam ke 9 ada fluktuasi kadar gula, namun cenderung meningkat. Hal ini terlihat dari kadar gula jam ke 9 yang lebih tinggi daripada jam ke 4. Hasil gula tertinggi didapatkan pada jam ke 24 Hidrolisis enzimatik. Untuk kondisi *pretreatment* tekanan 30 bar dan suhu 110°C, terjadi hal yang berbeda. Terlihat bahwa kadar gula dari jam ke 2 hingga jam 9 cenderung mengalami peningkatan. Sedangkan pada jam ke 9 hingga jam ke 24 Hidrolisis enzimatik



cenderung stabil. Berbeda dengan kedua variabel yang dibahas sebelumnya, pada kondisi *pretreatment* 40 bar dan 110°C terjadi penurunan konsentrasi gula pada jam ke 24 Hidrolisis enzimatik. Sehingga kadar gula tertinggi didapatkan justru pada jam ke 12 Hidrolisis enzimatik. Dari ketiga data diatas, kadar gula tertinggi diperoleh dari variabel *pretreatment* 40 bar dan 110°C dengan waktu Hidrolisis enzimatik 12 jam yaitu sebesar 0,29 g/L didalam kuvet atau 7,18 g/L didalam tabung.

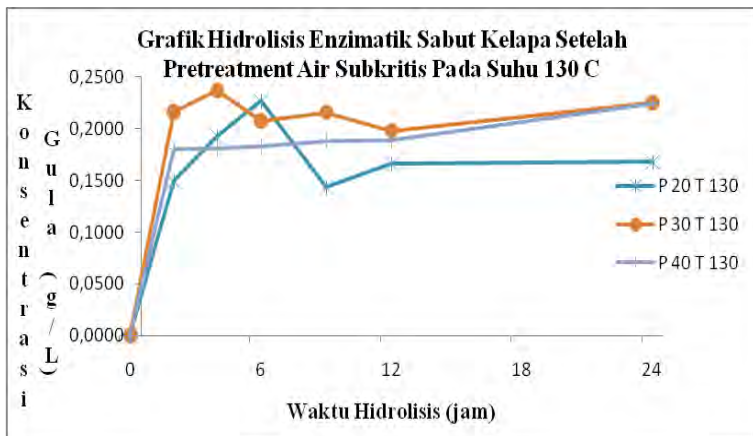
Secara teoritis, karakteristik dari hidrolisis enzimatik adalah memiliki *initial rate* hidrolisis yang tinggi, dan kemudian diikuti dengan semakin melambatnya laju Hidrolisis enzimatik dan tidak dapat dicapainya proses Hidrolisis enzimatik yang sempurna (Mansfield, dkk., 1999).



**Gambar IV.9 Laju Hidrolisis enzimatik Berdasarkan Teoritis dan Eksperimental (Andersen Natalija, 2008)**

**Tabel IV.12 Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan Pretreatment Air Subkritis untuk Variabel IV (20 bar), V (30 bar), dan VI (40 bar) (Suhu 130°C)**

Jam ke-	Variabel					
	IV		V		VI	
	(20 bar)		(30 bar)		(40 bar)	
	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)
0	0	0	0	0	0	0
2	0,24	3,73	0,34	5,41	0,29	4,51
4	0,31	4,81	0,38	5,92	0,29	4,52
6	0,36	5,67	0,33	5,19	0,29	4,57
9	0,23	3,59	0,34	5,39	0,3	4,70
12	0,26	4,15	0,32	4,95	0,3	4,72
24	0,27	4,20	0,36	5,63	0,36	5,61

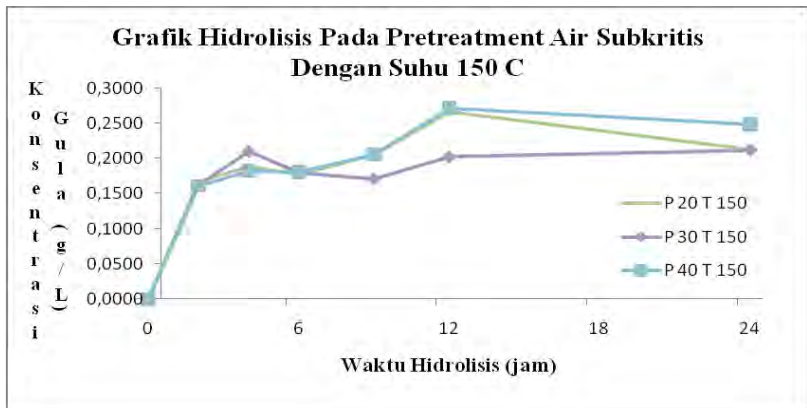


**Gambar IV.10 Perbandingan Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa Variabel IV (20 bar), V (30 bar) dan VI (40 bar) (Suhu 130°C)**

Dari Tabel IV.12 dan Gambar IV.10 didapatkan bahwa pada kondisi *pretreatment* tekanan 20 bar dan suhu 130°C, konsentrasi gula hasil Hidrolisis enzimatik cenderung meningkat pada jam ke 2 hingga jam ke 6, namun menurun pada jam ke 9 dan meningkat sedikit pada jam ke 12 lalu stabil pada jam ke 24. Hasil gula tertinggi didapatkan pada jam ke 6 Hidrolisis enzimatik. Untuk kondisi *pretreatment* tekanan 30 bar dan suhu 130°C, terjadi fluktuasi kadar gula seiring berjalannya waktu. Terlihat bahwa kadar gula dari jam ke 2 hingga jam 12 cenderung mengalami penurunan kemudian cenderung stabil pada akhir Hidrolisis enzimatik. Sedangkan, pada kondisi *pretreatment* 40 bar dan 130°C terjadi peningkatan kadar gula seiring berjalannya waktu Hidrolisis enzimatik. Dari ketiga data diatas, kadar gula tertinggi diperoleh dari variabel *pretreatment* 30 bar dan 130°C dengan waktu Hidrolisis enzimatik 4 jam yaitu sebesar 0,24 g/L didalam kuvet atau 5,92 g/L didalam tabung.

**Tabel IV.13 Hasil Hidrolisis Sabut kelapa dengan *Pretreatment* Air Subkritis untuk Variabel VII (20 bar), VIII (30 bar), dan IX (40 bar) (Suhu 150°C)**

Jam ke-	Variabel					
	VII		VIII		IX	
	(20 bar)		(30 bar)		(40 bar)	
	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)
0	0	0	0	0	0	0
2	0,27	4,18	0,26	4,04	0,26	4,03
4	0,3	4,73	0,33	5,25	0,29	4,56
6	0,28	4,45	0,29	4,49	0,29	4,53
9	0,34	5,16	0,27	4,29	0,33	5,14
12	0,43	6,68	0,32	5,06	0,43	6,79
24	0,34	5,34	0,34	5,30	0,40	6,21



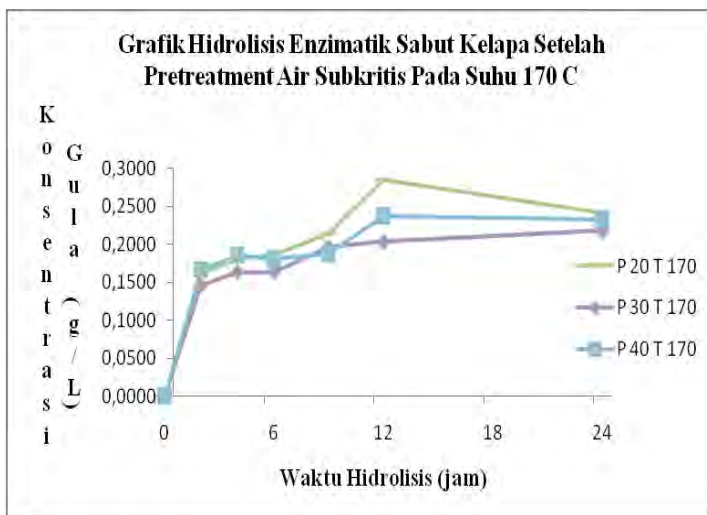
**Gambar IV.11 Perbandingan Hasil Hidrolisis enzimatis Sabut Kelapa Variabel VII (20 bar), VIII (30 bar) dan IX (40 bar) (Suhu 150°C)**

Dari Tabel IV.13 dan Gambar IV.11 didapatkan bahwa pada kondisi *pretreatment* tekanan 20 bar dan suhu 150°C, konsentrasi gula hasil Hidrolisis enzimatis cenderung meningkat pada jam ke 2 hingga jam ke 12, namun menurun pada jam ke 24. Hasil gula tertinggi didapatkan pada jam ke 12 Hidrolisis enzimatis yaitu sebesar 0,27 g/L didalam kuvet atau 6,68 g/L didalam tabung. Untuk kondisi *pretreatment* tekanan 30 bar dan suhu 150°C, terjadi peningkatan hingga jam ke 4 Hidrolisis enzimatis, namun menurun pada jam ke 9. Setelah jam ke 9, terjadi peningkatan kadar gula dan stabil hingga jam ke 24. Walaupun begitu, kadar gula tertinggi justru didapat pada jam ke 4 Hidrolisis enzimatis yaitu sebesar 0,21 g/L didalam kuvet atau 5,25 g/L didalam tabung. Sedangkan, pada kondisi *pretreatment* 40 bar dan 150°C terjadi peningkatan kadar hingga jam ke 12 Hidrolisis enzimatis namun sedikit menurun hingga jam ke 24. Penurunan kadar gula dari jam ke 12 hingga jam ke 24 tidak tajam tetapi cenderung konstan. Kadar gula tertinggi didapatkan pada jam ke 12 Hidrolisis enzimatis yaitu sebesar 0,27 g/L didalam kuvet atau 6,79 g/L. Dari ketiga data diatas, kadar gula

tertinggi diperoleh dari variabel *pretreatment* 40 bar dan 150°C dengan waktu Hidrolisis enzimatik 12 jam yaitu sebesar 0,27 g/L didalam kuvet atau 6,79 g/L didalam tabung.

**Tabel IV.14 Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa dengan *Pretreatment* Air Subkritis untuk Variabel X (20 bar), XI (30 bar), dan XII (40 bar) (Suhu 170°C)**

Jam ke-	Variabel					
	IV		V		VI	
	(20 bar)		(30 bar)		(40 bar)	
	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)	A	C dalam tabung (g/L)
0	0	0	0	0	0	0
2	0,26	4,06	0,23	3,65	0,26	4,15
4	0,29	4,53	0,26	4,09	0,29	4,63
6	0,30	4,69	0,26	4,09	0,29	4,51
9	0,34	5,34	0,31	4,92	0,30	4,68
12	0,46	7,13	0,33	5,09	0,38	5,92
24	0,38	6,03	0,35	5,45	0,37	5,81

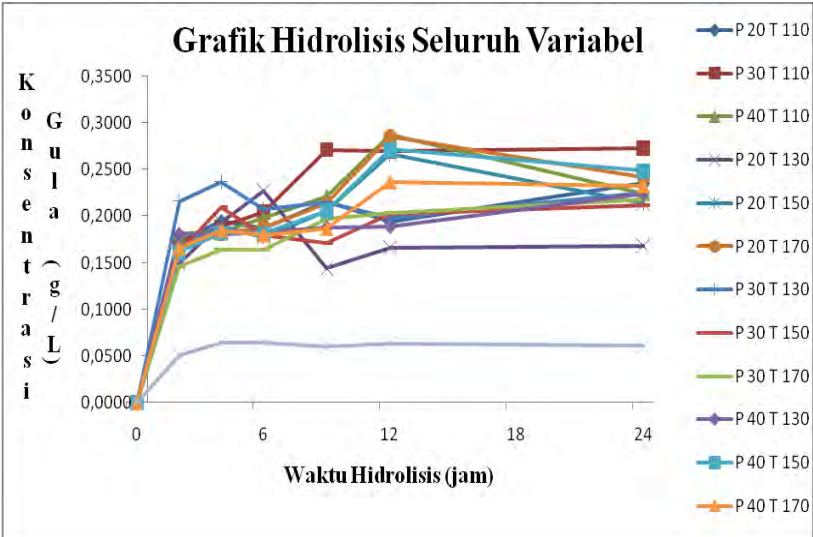


**Gambar IV.12 Perbandingan Hasil Hidrolisis enzimatik Sabut kelapa Variabel VII (20 bar), VIII (30 bar) dan IX (40 bar) (Suhu 170°C)**

Dari Tabel IV.14 dan Gambar IV.12 didapatkan bahwa pada tiap kondisi *pretreatment* air subkritis, terjadi fluktuasi konsentrasi gula seiring berjalannya lama Hidrolisis enzimatik. Pada kondisi *pretreatment* tekanan 20 bar dan suhu 170°C, konsentrasi gula hasil Hidrolisis enzimatik cenderung meningkat pada jam ke 2 hingga jam ke 12, namun menurun tajam pada jam ke 24. Hasil gula tertinggi didapatkan pada jam ke 12 Hidrolisis enzimatik yaitu sebesar 0,28 g/L didalam kuvet atau 7,13 g/L didalam tabung. Untuk kondisi *pretreatment* tekanan 30 bar dan suhu 170°C, terjadi peningkatan hingga jam ke 24 Hidrolisis enzimatik. Setelah jam ke 12, terjadi peningkatan kadar gula yang stabil hingga jam ke 24. Kadar gula tertinggi didapat pada jam ke 24 Hidrolisis enzimatik yaitu sebesar 0,22 g/L didalam kuvet atau 5,45 g/L didalam tabung. Sedangkan, pada kondisi *pretreatment* 40 bar dan 170°C terjadi fluktuasi kadar gula, namun penurunan kadar gula yang terjadi tidak terlalu besar. Penurunan kadar gula

terjadi pada jam ke 6 namun hanya sedikit dan kemudian meningkat kembali. Antara jam ke 12 dan jam ke 24 terjadi sedikit penurunan namun cenderung konstan. Kadar gula tertinggi didapatkan pada jam ke 12 Hidrolisis enzimatik yaitu sebesar 0,24 g/L didalam kuvet atau 5,92 g/L. Dari ketiga data diatas, kadar gula tertinggi diperoleh dari variabel *pretreatment* 20 bar dan 170°C dengan waktu hidrolisis enzimatik 12 jam yaitu sebesar 0,2852 g/L didalam kuvet atau 7,1310 g/L didalam tabung.

Apabila semua variabel dibandingkan maka grafiknya adalah sebagai berikut dan dibandingkan dengan hasil hidrolisis sabut kelapa yang tidak dilakukan *pretreatment* (Ageng & Ginting, 2014):



**Gambar IV.13 Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik Semua Variabel dengan Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis enzimatik Tanpa *Pretreatment***

Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa, *pretreatment* air subkritis mampu meningkatkan kemampuan enzim untuk melakukan hidrolisis enzimatik pada sabut kelapa. Kecenderungan hasil yang menurun disebabkan oleh masih menempelnya enzim pada padatan sabut kelapa yang menyebabkan hasil hidrolisis enzimatik kurang optimal. Selain itu, pengambilan larutan yang dipenuhi oleh padatan, juga sangat mempengaruhi hasil analisa DNS. Sehingga hasil cairan yang terambil bukan yang mengandung gula reduksi, melainkan bisa justru lebih banyak kandungan buffer sitrat untuk mengontrol pH. DNS yang digunakan juga mempengaruhi hasil analisa, sehingga saat dianalisa dengan spektrofotometer apabila berbeda DNS, hasil analisa juga berbeda. Hidrolisis enzimatik yang lebih baik disebabkan oleh *Crystallinity Index* (CrI) dari sabut kelapa yang menurun. Sebelum dilakukan *pretreatment* air subkritis CrI dari sabut kelapa adalah 48,8% sedangkan setelah dilakukan *pretreatment* air subkritis pada tekanan 40 bar dan suhu 110°C, CrI dari sabut kelapa menurun menjadi 39,91%. Pengaruh dari CrI ini sendiri adalah menunjukkan perubahan morfologi material (terutama selulosa) yang secara signifikan berubah. Semula, struktur morfologis sabut kelapa lebih kasar/keras berubah menjadi lebih lunak/halus. Sehingga, bagian permukaan substrat ini lebih mudah ditemplei oleh enzim selulase dan hidrolisis enzimatik terjadi lebih optimal (Zhu,2012).

Dari konsentrasi gula reduksi yang didapat kemudian dapat dihitung yield yang diperoleh. Dengan rumus:

$$yield (/DSK) = \frac{\text{massa gula reduksi}}{\text{massa sabut kelapa yang dihidrolisis}}$$

Sehingga diperoleh persentase yield yang dihasilkan.



**Tabel IV.15 Yield Gula Reduksi dari Hidrolisis Enzimatik  
Sabut Kelapa Setelah *Pretreatment* Air Subkritis**

Variabel			Jam ke	Konsentrasi Gula (g/L)	Yield*	% Yield**
No	P (bar)	T (°C)				
1	20	110	24	5,88	0,1754	17,54
2	30	110	24	6,83	0,2032	20,32
3	40	110	12	7,18	0,2136	21,36
4	20	130	6	5,67	0,1693	16,93
5	30	130	4	5,92	0,1768	17,68
6	40	130	24	5,61	0,1674	16,74
7	20	150	12	6,68	0,1992	19,92
8	30	150	24	5,30	0,1580	15,80
9	40	150	12	6,79	0,2025	20,25
10	20	170	12	7,13	0,2121	21,21
11	30	170	24	5,45	0,1623	16,23
12	40	170	12	5,92	0,1774	17,74

\*Yield didapatkan dari massa gula reduksi/massa sabut kelapa yang dihidrolisis enzimatik

\*\*Yield x 100%

Tabel IV.15 menunjukkan Yield gula reduksi tertinggi tiap variabel setelah dihidrolisis. Untuk yield tiap waktu hidrolisis dapat dilihat pada lampiran. Yield tertinggi didapatkan pada sabut kelapa yang telah dipretreatment pada tekanan 40 bar dan suhu 110°C yaitu pada 21,36 gr gula / 100 gr sabut kelapa. Hal ini disebabkan oleh kadar gula yang didapatkan selama hidrolisis enzimatik sangat tinggi dan dipengaruhi oleh perubahan struktur kristal dan permukaan sabut kelapa tersebut sehingga proses hidrolisis enzimatik berjalan lebih optimal. Yield yang fluktuatif seiring berjalannya waktu hidrolisis enzimatik dipengaruhi oleh peningkatan dan penurunan kadar gula tiap waktu hidrolisis.

Kadar gula tiap waktu semakin meningkat seiring berjalannya waktu hidrolisis enzimatis (Zhu, dkk, 2012).

**Tabel IV.16 Hasil Analisa Gravimetri Sebelum dan Setelah Pretreatment Air Subkritis**

No	Variabel	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa
1	Untreated	48,43%	18,64%	21,92%
2	P 20 T 110	44,42%	15,71%	25,89%
3	P 30 T 110	39,47%	17,44%	25,25%
4	P 40 T 110	45,28%	13,15%	27,31%
5	P 20 T 130	53,56%	11,95%	23,14%
6	P 30 T 130	52,46%	13,83%	24,39%
7	P 40 T 130	42,58%	18,22%	26,89%
8	P 20 T 150	53,97%	11,70%	27,57%
9	P 30 T 150	49,55%	11,64%	26,61%
10	P 40 T 150	54,43%	4,51%	27,67%
11	P 20 T 170	51,42%	11,39%	25,23%
12	P 30 T 170	59,38%	9,23%	26,17%
13	P 40 T 170	52,46%	11,84%	23,21%

Dari hasil analisa gravimetri yang diusulkan oleh Datta dan Rathin, terlihat bahwa persentase lignin tiap variabel cenderung fluktuatif. Ada persen lignin yang meningkat dan ada yang menurun. Hal ini terjadi dikarenakan kadar hemiselulosa dan selulosa tiap variabel cenderung menurun saat *pretreatment* air subkritis. Kandungan hemiselulosa dan selulosa inilah yang berubah menjadi gula yang terlarut dalam fraksi *liquid* setelah *pretreatment* air subkritis. Jika ditinjau dari neraca massa tiap komponen maka hasilnya adalah sebagai berikut,

**Tabel IV.17 Neraca Massa Lignin Setelah *Pretreatment* Air Subkritis**

Variabel	Massa Lignin Masuk (gr)	Massa Lignin Keluar (gr)	Massa Lignin Terhidrolisis (gr)
P 20 T 110	2,91	2,05	0,86
P 30 T 110	2,91	1,80	1,11
P 40 T 110	2,91	1,96	0,95
P 20 T 130	2,91	2,51	0,40
P 30 T 130	2,91	2,49	0,42
P 40 T 130	2,91	1,96	0,95
P 20 T 150	2,91	2,24	0,67
P 30 T 150	2,91	2,45	0,45
P 40 T 150	2,91	2,31	0,60
P 20 T 170	2,91	2,07	0,84
P 30 T 170	2,91	2,41	0,50
P 40 T 170	2,91	2,11	0,79

Sedangkan apabila dilihat dari analisa gravimetri yang diusulkan oleh Datta dan Rathin (1981), dapat dilihat bahwa massa lignin tiap variabel lebih kecil dibandingkan saat sebelum dilakukan *pretreatment* dengan air subkritis. Terlihat bahwa variabel III (P 40 T 110) memiliki kandungan lignin yang lebih rendah dibandingkan variabel lain yaitu sebesar 1,96 gram. Variabel IV (P 20 T 130) memiliki kandungan lignin yang lebih tinggi yaitu sebesar 2,51 gram sehingga, menghambat terjadinya reaksi hidrolisis enzimatik. Struktur lignin yang keras menyebabkan lignoselulosa sangat susah untuk didegradasi secara enzimatik. Sehingga, kandungan lignin yang tinggi dapat menghambat hidrolisis enzimatik dari hemiselulosa dan selulosa untuk menghasilkan gula reduksi (Hon, dkk 2001). Namun tak

hanya kandungan lignin saja yang mempengaruhi hidrolisis enzimatik. Kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam padatan juga sangat berpengaruh pada hidrolisis enzimatik.

**Tabel IV.18 Neraca Massa Hemiselulosa Setelah *Pretreatment* Air Subkritis**

Variabel	Massa Hemiselulosa Masuk (gr)	Massa Hemiselulosa Keluar (gr)	Massa Hemiselulosa Terhidrolisis (gr)
P 20 T 110	1,12	0,72	0,39
P 30 T 110	1,12	0,79	0,32
P 40 T 110	1,12	0,57	0,55
P 20 T 130	1,12	0,56	0,56
P 30 T 130	1,12	0,66	0,46
P 40 T 130	1,12	0,84	0,28
P 20 T 150	1,12	0,49	0,63
P 30 T 150	1,12	0,58	0,54
P 40 T 150	1,12	0,19	0,93
P 20 T 170	1,12	0,46	0,66
P 30 T 170	1,12	0,37	0,75
P 40 T 170	1,12	0,48	0,64

Jika dilihat pada massa hemiselulosa dan selulosa tiap variabel terlihat bahwa terjadi penurunan massa hemiselulosa dan selulosa tiap variabel menjadi gula reduksi pada fraksi *liquid*. Meskipun variabel XII (P 40 T 170) memiliki hasil gula reduksi fraksi *liquid* terbaik, tidak menjamin saat dihidrolisis enzimatik juga didapatkan hasil gula tertinggi. Sebab kandungan hemiselulosa dan selulosanya jika dibandingkan dengan variabel lain masih lebih kecil dibandingkan dengan variabel III (P 40 T 110) yang merupakan variabel dengan hasil hidrolisis enzimatik terbaik.

**Tabel IV.19 Neraca Massa Selulosa Setelah *Pretreatment* Air Subkritis**

Variabel	Massa Selulosa Masuk (gr)	Massa Selulosa Keluar (gr)	Massa Selulosa Terhidrolisis (gr)
P 20 T 110	1,32	1,19	0,12
P 30 T 110	1,32	1,15	0,17
P 40 T 110	1,32	1,18	0,14
P 20 T 130	1,32	1,08	0,23
P 30 T 130	1,32	1,16	0,16
P 40 T 130	1,32	1,24	0,08
P 20 T 150	1,32	1,14	0,17
P 30 T 150	1,32	1,32	0,00
P 40 T 150	1,32	1,17	0,14
P 20 T 170	1,32	1,02	0,30
P 30 T 170	1,32	1,06	0,26
P 40 T 170	1,32	0,94	0,38

Namun terdapat beberapa variabel dengan kandungan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi serta lignin lebih rendah justru memiliki yield hidrolisis enzimatik yang lebih rendah dibandingkan dengan variabel III (P 40 T 110). Contohnya variabel VI (P 40 T 130). Yield gula reduksi tertinggi variabel ini hanyalah 16,74 gula reduksi / 100 gram sabut kelapa. Hal ini terjadi dikarenakan beberapa faktor, antara lain ketidakakuratan analisa gravimetris yang diusulkan Datta dan Rathin, sehingga hasil persen selulosa dan hemiselulosa dalam sabut kelapa pretreatment sepertinya tinggi, namun kenyataannya belum tentu benar. Sehingga, perlu dilakukan analisa ulang menggunakan metode gravimetris tersebut.

**Tabel IV.20 Hasil Analisa DNS Total Setelah *Pretreatment* Air Subkritis**

Var	Mass a feed	Hasil Gravimetri			DNS Liquid		
		S	H	(S+H) **	g/L	Koreksi ***	g gula
0*	6	1,32	1,12	2,44	1,48	1,48	0,00
I	6	1,32	1,12	2,44	1,61	1,48	0,02
II	6	1,32	1,12	2,43	1,88	1,48	0,05
III	6	1,32	1,12	2,43	1,91	1,48	0,05
IV	6	1,32	1,12	2,44	3,19	1,48	0,21
V	6	1,32	1,12	2,43	3,50	1,48	0,24
VI	6	1,32	1,12	2,43	3,04	1,48	0,19
VII	6	1,32	1,12	2,44	4,31	1,48	0,34
VIII	6	1,32	1,12	2,43	4,93	1,48	0,41
IX	6	1,32	1,12	2,44	4,75	1,48	0,39
X	6	1,32	1,12	2,44	4,70	1,48	0,39
XI	6	1,32	1,12	2,44	4,69	1,48	0,39
XII	6	1,32	1,12	2,43	7,40	1,48	0,71

\*0: Unpretreatment

\*\* (S+H): Selulosa + Hemiselulosa

\*\*\*Koreksi: Diambil dari hasil analisa DNS liquid sabut kelapa yang tidak dilakukan *pretreatment*

Koreksi diambil dari sabut kelapa yang tidak dilakukan *pretreatment*, lalu dilarutkan dalam aquades, kemudian fraksi liquid diambil dan dianalisa dengan spektrofotometer. Koreksi memiliki satuan g/L dan menjadi titik acuan dalam pengukuran konsentrasi gula dari sabut kelapa yang sudah dipretreatment.

**Tabel IV.21 Hasil Analisa DNS Total Setelah *Pretreatment* Air Subkritis dan Hidrolisis Enzimatik**

Var	Massa feed	DNS Hidrolisis Enzimatik			
		g/L	Mp** **	G gula	massa gula total
0*	6	1,49	6,00	0,04	0,27
I	6	5,88	4,61	0,18	0,81
II	6	6,83	4,55	0,20	0,93
III	6	7,18	4,32	0,22	0,93
IV	6	5,67	4,68	0,17	0,80
V	6	5,92	4,74	0,18	0,84
VI	6	5,61	4,60	0,17	0,77
VII	6	6,68	4,15	0,20	0,83
VIII	6	5,30	4,95	0,16	0,79
IX	6	6,79	4,24	0,20	0,86
X	6	7,13	4,02	0,21	0,86
XI	6	5,45	4,05	0,16	0,66
XII	6	5,92	4,03	0,18	0,72

\*\*\*\*Mp: Massa setelah *pretreatment* air subkritis

Koreksi diambil dari sabut kelapa yang tidak dilakukan *pretreatment*, lalu dilarutkan dalam aquades, kemudian fraksi liquid diambil dan dianalisa dengan spektrofotometer. Koreksi memiliki satuan g/L dan menjadi titik acuan dalam pengukuran konsentrasi gula dari sabut kelapa yang sudah dipretreatment

**Tabel IV.22 Yield Gula Reduksi Total Setelah *Pretreatment*  
Air Subkritis dan Hidrolisis Enzimatis**

Variabel	g gula total*****	Yield 1 (%)*****	Yield 2 (%)*****
0*	0,27	4,47	11,01
I	0,83	13,81	34,04
II	0,98	16,34	40,29
III	0,98	16,36	40,34
IV	1,00	16,68	41,13
V	1,09	18,08	44,57
VI	0,96	16,03	39,51
VII	1,17	19,47	48,01
VIII	1,20	20,00	49,31
IX	1,26	20,91	51,56
X	1,25	20,77	51,20
XI	1,05	17,45	43,01
XII	1,43	23,76	58,58

\*\*\*\*\*g gula total = gr gula hasil *pretreatment* air subkritis + gr gula hasil hidrolisis enzimatis

\*\*\*\*\*Yield 1 = Massa gula total / Total sabut kelapa masuk

\*\*\*\*\*Yield 2 = Massa gula total / gram (Selulosa + Hemiselulosa)

Jika dilihat dari tabel IV.20 terlihat bahwa yield tertinggi didapatkan dari sabut kelapa yang diberikan *pretreatment* air subkritis pada tekanan 40 bar dan suhu 170 atau variabel XII. Yaitu dengan yield 23,76 gram gula reduksi per 100 gram sabut kelapa atau 58,58 gram gula reduksi per 100 gram selulosa dan hemiselulosa. Hasil fluktuatif ini juga didapatkan oleh Zhang & Wu (2014) dalam penelitian mereka tentang bagasse tebu dengan *pretreatment* air subkritis dan kemudian dihidrolisis enzimatis.



Semakin meningkatnya suhu maupun tekanan tidak menurunkan hasil yang konsisten naik ataupun turun. Melainkan, hasil yang didapatkan oleh Zhang & Wu juga fluktuatif dan optimum pada kondisi tekanan 5 MPa, suhu 180°C dengan yield 37,99 gram glukosa per 100 gram bagasse tebu.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **V.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dan analisa yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Setelah dilakukan *pretreatment* dengan metode air subkritis, hasil konsentrasi gula reduksi terbaik didapatkan pada variabel XII ( $P = 40$  bar,  $T = 170$  °C) dengan yield 11,83 gram gula reduksi / 100 gram sabut kelapa
2. Hasil hidrolisis terbaik dilihat dari perolehan konsentrasi gula reduksi dengan menggunakan enzim selulase murni didapatkan pada variabel IX ( $P = 40$  bar,  $T = 110$  °C), diperoleh konsentrasi gula reduksi terbesar pada jam ke-12 dengan yield 21,36 gram gula reduksi / 100 gram sabut kelapa.
3. Jika kedua hasil gula yang didapatkan digabungkan, maka hasil gula reduksi tertinggi didapatkan pada variabel XII ( $P = 40$  bar,  $T = 170$  °C) yaitu sebesar 23,76 gram gula reduksi / 100 gram sabut kelapa
4. Berdasarkan hasil analisa XRD (*X-Ray Diffraction*), metode *pretreatment* air subkritis dapat mengurangi tingkat kristalinitas dari struktur selulosa. Sehingga, semakin tinggi tekanan dan suhu operasi yang digunakan pada saat *pretreatment* dengan metode air subkritis, maka tingkat kristalinitas dari struktur selulosa juga akan semakin menurun.

#### **V.2 Saran**

1. Perlu diperhatikan agar saat penyaringan pada analisa dengan metode yang dikembangkan oleh Datta dan Rathin (1981), pH air cucian harus sampai netral atau

sama dengan pH air, sehingga tidak mempengaruhi perhitungan massa selulosa, hemiselulosa dan lignin.

2. Perlu diperhatikan untuk kerapatan tutup dan sambungan aliran gas alat reaktor subkritis, apabila kurang rapat sedikit saja dapat menyebabkan kebocoran dan berbahaya apabila diabaikan.
3. Perlu dilakukan pengecekan secara berkala sewaktu melakukan percobaan dengan reaktor air subkritis, dikarenakan suhu tidak bisa mencapai sesuai dengan *set point* yang ditentukan. Sebaiknya dinaikan *set point*-nya setiap beberapa menit dengan kenaikan sebesar sekian derajat (misal 10°C) secara konsisten
4. Analisa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sebagai patokan untuk mengetahui jenis-jenis gula reduksi yang dihasilkan dan inhibitor reaksi hidrolisis enzimatis yang merupakan *byproduct* dari lignin
5. Dilakukan penelitian terhadap waktu hidrolisis air subkritis sehingga dapat mengetahui lama waktu optimal untuk mendapatkan hasil gula optimal.
6. Meneliti juga untuk perkiraan waktu pemanasan untuk menentukan titik awal hidrolisis air subkritis dengan indikator sudah terbentuk gula atau belum pada titik tersebut (tanpa menentukan variabel suhu).

## DAFTAR PUSTAKA

- Anindyawati, Trisannti. 2009. PROSPEK ENZIM DAN LIMBAH LIGNOSELULOSA UNTUK PRODUKSI BIOETANOL. BS, Volume 44, Nomor 1, 49-56.
- Asgher, M., Ahmad, Z., and Iqbal, H.M.N. (2013), "Alkali and Enzymatic Delignification of Sugarcane Bagasse to Expose Cellulose Polymers for Saccharification and Bioethanol Production", *Industrial Crops and Products* 44:488-495
- Bilba, K., Arsene, M-A., and Oensanga, A. (2007), "Study of banana and coconut wber botanical composition, thermaldegradation and textural observations", *Bioresource Technology* 98:58-68.
- Chunping, Y., Zhiqiang, S., Guoce, Y., Jianlong, W. (2008). Effect and after effect of  $\gamma$  radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, 99, 6240–6245.
- Datta, Rathin, (1981), "Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components", *Biotechnology and Bioengineering* 23:2167-2170.
- Esteghlalian, A., A.G. Hashimoto, J.J. Fenske, and M.H. Penner. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology* 59: 129–136.
- Fengel, D., Wegener G. (1985). Kayu: Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi. Gadjra Mada University Press, Indonesian Edition, 124-149.
- Fessenden., Ralph, J., Fessenden J.S., Logue, M.W. (1998). *Organik Chemistry*. Brooks/Cole Publishing Company, 6<sup>th</sup> Edition, 952-953.

- Girio, F.M., Fonseca, C, Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Lukasik, R.B. (2010). Hemicellulose for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800.
- Hon, David N.S., Shiraishi, Nobuo. (2001). *Wood and cellulosic chemistry*. MARCEL DEKKEINRC,. NEW YORK BASEL.
- Jingjing, Li, (2011), "Isolation of Lignin from wood", Faculty of Tecnology Imatra
- Ju, Y.H., Huynh, L.H., Kasim, N.S., Guo, T.J., Wang, J.H. (2011). Analysis of soluble and insoluble fraction of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymer*, 83, 591-599.
- King, J.W., Srinivas, K., Guevara, O., Lu, Y.W., Zhang, D., Wang, Y.J. (2012). Reactive high pressure carbonated water pretreatment prior to enzymatic saccharification of biomass substrate. *The Journal of Supercritical Fluids*, 66, 221-231.
- Kumar, S., Gupta, R., Lee, Y.Y., Gupta, R.B. (2010). Cellulose pretreatment in subcritical water: Effect of temperatur on molecular structure and enzymatic reactivity. *Bioresource Technology*, 101, 1337-1347.
- Mahmud, Zainal., & Ferry, Yulius. (2005). *Prospek Pengolahan Hasil Samping Buah Kelapa*. Perspektif, Volume 4 Nomor 2, 55.
- Mohan, Mood., Banerjee, Tamal., Goud, V. 2015. "Hydrolysis of bamboo biomass by subcritical water treatment." *Bioresource Technology*, 191, 244–252.
- Prado, J. M., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M.A., Follegatti-Romero, L. A., Filho, F. M., Meireles M. A. A. (2014). Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 89, 89-98.
- Sabiha-Hanim, S., Noor, M. A. M., Rosma, A., (2014) Fractionation of oil palm frond hemicelluloses by water or

- alkaline impregnation and steam explosion. *Carbohydrate Polymers*, 115, 533-539.
- Sasaki, M., Adschiri, T., Arai, K. (2004). Kinetics of cellulose conversion at 25Mpa in sub and supercritical water. *AIChE JOURNAL*, 50, 192-202.
- Shafiee, S., Topal, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished. *Energy Policy*, 37, 181–189.
- Sjöström, E. (1998). *Kimia kayu, dasar-dasar dan penggunaan*. Gaja Mada Academic Press, Edisi kedua, 68-79.
- Spigno, G., Pizzorno, T., De Faveri, D.M. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, 99, 4329–4337.
- Toor, S.S., Rosendahl, L., Rudolf, A.A. (2011). Review of subcritical water technologies. *Energy*, 36, 2328-2342.
- Van Dam., J.E.G, Martien J.A. van den Oever., Keijsers, E.R.P., Van der Putten, J.C., Anayron, C., Josol, F.,Peralta, A. c. (2006). Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk Part 2: Coconut husk morphology, composition and properties. *Industrial Crops and Products* 24, 96–104.
- Van Dyk, J. S., Pletschke, B. I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30, 1458-1480.
- Wen, D., Jiang, H., Zhang, K. (2009). Supercritical fluids technology for clean biofuel production. *Progress in Natural Science*, 19, 273-284.
- Wiselogle, A.E., F.A. Agblevor, D.K. Johnson, S. Deutch, J.A. Fennell, and M.A. Sanderson. 1996. Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. *Bioresource Technology* 56: 103–109.
- Zhang, H., Wu, Shubin. 2013. “Subcritical CO<sub>2</sub> pretreatment of sugarcane bagasse and its enzymatic hydrolysis for sugar production”. *Bioresource Technology*, 149, 546–550.

- Zhang, H., Wu, Shubin. 2014. "Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse". *Bioresource Technology*, 158, 161–165.
- Zhao, Y., Lu, W.J., Wang, H.T. (2009). Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. *Chemical Engineering Journal*, 150, 411-417.
- Zhu, Z., Zhu, M., and Wu, Z., (2012), "Pretreatment of sugarcane bagasse with  $\text{NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}_2$  and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production", *Bioresource Technology* 119:199-207.
- Zumdahl, S.S., *Chemical Principles*, (1992). 1<sup>st</sup> ed., D.C. Heath and Company, pp. 979-980
- <http://www.bp.com/>. 19 Januari 2015.

## **APPENDIKS A**

### **A-1**

#### **HEMISELULOSA, DAN LIGNIN PADA DEBU SABUT KELAPA MENGGUNAKAN METODE DATTA & RATHIN**

Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin  
Debu Sabut Kelapa Sebelum Pretreatment

##### **1. Perhitungan Kadar Selulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,7282-0,5083)/1,0031 \times 100 \\ &= 21,923 \quad \%\end{aligned}$$

##### **2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,9151-0,7282)/1,0031 \times 100 \\ &= 18,636 \quad \%\end{aligned}$$

##### **3. Perhitungan Kadar Lignin**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,5083-0,0225)/1,0031 \times 100 \\ &= 48,427 \quad \%\end{aligned}$$

### **A-2**

#### **PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM**



### Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\begin{aligned}
 \text{Massa glukosa} &= 0,367 \text{ gram} \\
 \text{Volume buffer sitrat pH 5,} &= 100 \text{ ml} \\
 \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\
 \text{Mol glukosa} &= \frac{\text{massa}}{\text{BM}} \\
 &= \frac{0,367 \text{ gram}}{180 \text{ gram/mol}} \\
 &= 0,002 \text{ mol} \\
 &= 2038,9 \text{ } \mu\text{mol} \\
 \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \frac{\text{mol glukosa}}{\text{volume}} \\
 &= \frac{2038,9 \text{ } \mu\text{mol}}{100 \text{ ml}} \\
 &= 20,389 \text{ } \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi di tabung} &= \frac{\text{konsentrasi}}{\text{volume total}} \\
 \text{reaksi} &= \frac{20,389 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 4,078 \text{ } \mu\text{mol/ml} \\
 &= \frac{\text{reaksi} \times \text{larutan}}{\text{glukosa}} \\
 \text{Konsentrasi di kuvet} &= \frac{\text{glukosa}}{\text{volume total}} \\
 &= \frac{4,078 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 0,163 \text{ } \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan

### A-3

## PERHITUNGAN ENZIM

Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase Murni *A.niger*

Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi} = 1,138$$

$$\text{Absorbansi larutan koreksi} = 0,905$$

$$\text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} = A_1 - A_2$$

$$= 0,233$$

$$\text{Konsentrasi glukosa} = A \times \text{slope kurva}$$

$$= 0,233 \times 2,329$$

$$= 0,543 \text{ } \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Mol glukosa dalam kuvet} = \text{Konsentrasi}$$

$$= 1,032 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 5$$

$$= 2,713 \text{ } \mu\text{mol}$$

$$\text{Aktivitas enzim selulase} = \text{mol}$$

$$= 5,159 \text{ } \mu\text{mol} / 10 \text{ ml}$$

$$= 0,271 \text{ U/volume}$$

$$= 0,516 \text{ U} / 0,2 \text{ ml}$$

$$= 1,357 \text{ U/ml}$$

$$\text{Kebutuhan enzim} = \text{Aktivitas enzim}$$

$$(93\text{U}/5\text{gr}$$

$$= 68,552 \text{ Debu}$$

$$\text{Sabut}$$

$$\text{Kelapa})$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi di kuvet} &= \frac{\text{konsentrasi di tab.}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{0,737 \text{ gram/L} \times 0,2}{5 \text{ ml}} \\ &= 0,029 \text{ gram/L} \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 0,634x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan  $x$  sebagai absorbansi.

## Perhitungan Konsentrasi dan Massa Gula Reduksi

### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim selulase variabel I pada jam ke-12

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbansi} &= 0,1215 \\
 \text{Konsentrasi gula di kuvet} &= \text{Absorbansi} \times \\
 &= 0,1215 \times 0,634 \\
 &= 0,077 \text{ gram/L} \\
 \\ 
 \text{Konsentrasi gula di} &= \frac{\text{di kuvet} \times \text{volume}}{\text{erlenmeyer} \quad \text{kuvet}} \\
 &= \frac{0,055 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} \\
 &= 1,926 \text{ gram/L}
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 2. Perhitungan massa gula reduksi

Diambil data hasil konsentrasi gula hidrolisis enzim

$$\begin{aligned}
\text{Konsentrasi gula di erlenmeyer} &= 1,926 \text{ gram/L} \\
\text{Volume larutan hidrolisis} &= 30 \text{ ml} \\
\text{Massa gula reduksi} &= \text{konsentrasi gula} \times \\
&= 1,617 \text{ gram/L} \times (45 \\
&= 0,058 \text{ gram}
\end{aligned}$$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan yield gula reduksi

selulase variabel I pada jam ke-12

$$\text{Massa gula reduksi} = 0,058$$

$$\begin{aligned}
\text{Yield gula reduksi} &= \frac{\text{massa gula reduksi}}{\text{massa (hemiselulosa+selulosa)}} \\
&= \frac{0,058 \text{ gram}}{(0,81964 + 0,421641)} \\
&= \frac{0,045 \text{ gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa)}}
\end{aligned}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

## A-5

### PERHITUNGAN HASIL LIQUID *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS

Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi

$$\begin{aligned}
\text{Massa glukosa} &= 0,369 \text{ gram} \\
\text{Volume buffer sitrat pH 3} &= 100 \text{ ml} \\
\text{Konsentrasi glukosa awal} &= \frac{\text{massa glukosa/}}{100 \text{ ml}} \\
&= \frac{0,369 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \\
&= 0,00369 \text{ gram/ml} \\
&= 3,685 \text{ gram/L}
\end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

$$\text{Konsentrasi di tabung reaksi} = \frac{\text{konsentrasi}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{3,685 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,737 \text{ gram/L}$$

$$\text{Konsentrasi di kuvet} = \frac{\text{konsentrasi di tab.}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{0,737 \text{ gram/L} \times 0,2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$= 0,1474 \text{ gram/L}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 0,634x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan  $x$  sebagai absorbansi.

## Perhitungan Konsentrasi dan Massa Gula Reduksi

### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi

Diambil salah satu data absorbansi larutan dari hasil

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbansi} &= 0,1043 \\
 \text{Konsentrasi gula di kuvet} &= \text{Absorbansi} \times \\
 &= 0,104 \times 0,616 \\
 &= 0,064 \text{ gram/L} \\
 &\quad \text{di kuvet} \times \text{volume} \\
 \text{Konsentrasi gula} &= \frac{\text{kuvet}}{\text{volume sampel}} \\
 \text{keseluruhan} &= \frac{0,064 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} \\
 &= 1,606 \text{ gram/L}
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

## 2. Perhitungan massa gula reduksi hasil pretreatment

Diambil salah satu data absorbansi larutan dari hasil

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi gula keseluruhan} &= 1,606 \text{ gram/L} \\
 \text{Volume larutan hasil} &= 120 \text{ ml} \\
 \text{Massa gula reduksi} &= \text{konsentrasi gula} \times \\
 &\quad \text{volume larutan} \\
 &= (1,606 \text{ g/L} - 1,48 \\
 &\quad \text{g/L}) \times (120/1000) \\
 &= 0,015 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

## 3. Perhitungan yield gula reduksi

Diambil data hasil massa gula hidrolisis enzim selulase

$$\begin{aligned}
 \text{Massa gula reduksi} &= 0,015 \text{ gram} \\
 &\quad \underline{\text{massa gula reduksi}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Yield gula reduksi} &= \frac{\text{massa (hemiselulosa+selulosa)}}{\text{6,0037*(0,4842+0,1863)}} \\
 &= \frac{0,015 \text{ gram}}{\text{6,0037*(0,4842+0,1863)}} \\
 &= \frac{0,006 \text{ gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa)}}
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

$$\text{Massa gula reduksi} = 0,015 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Yield gula reduksi} &= \frac{\text{massa gula reduksi}}{\text{massa sabut kelapa masuk}} \\
 &= \frac{0,141 \text{ gram}}{6,0037} \\
 &= \frac{0,032 \text{ gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa)}}
 \end{aligned}$$



## A-6

### PERHITUNGAN HASIL GULA AKHIR SETELAH *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS DAN HIDROLISIS ENZIMATIK

#### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi hasil pretreatment

Diambil salah satu data absorbansi larutan dari hasil

$$\text{Absorbansi} = 0,1043$$

$$\text{Konsentrasi gula di kuvet} = \frac{\text{Absorbansi}}{\text{slope kurva}}$$

$$= 0,104 \times 0,616$$

$$= 0,064 \text{ gram/L}$$

$$\text{Konsentrasi gula keseluruhan} = \frac{\text{konsentrasi gula}}{\text{volume sampel}}$$

$$= \frac{0,064 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}}$$

$$= 1,606 \text{ gram/L}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

#### 2. Perhitungan massa gula reduksi hasil pretreatment

Diambil salah satu data absorbansi larutan dari hasil

*pretreatment* air subkritis variabel I

$$\text{Konsentrasi gula keseluruhan} = 1,606 \text{ gram/L}$$

$$\text{Volume larutan hasil} = 120 \text{ ml}$$

$$\text{Massa gula reduksi} = \text{konsentrasi gula} \times$$

$$= (1,606 \text{ g/L} - 1,48 \text{ g/L}) \times (120/1000)$$

$$= 0,015 \text{ gram}$$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis

Diambil salah satu data absorbansi larutan dari hasil *pretreatment* air subkritis variabel I

$$\text{Absorbansi} = 0,375$$

$$\text{Konsentrasi gula di kuvet} = \text{slope kurva}$$

$$= 0,375 \times 0,616$$

$$= 0,231 \text{ gram/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi gula} &= \frac{\text{konsentrasi gula}}{\text{di kuvet} \times \text{volume}} \\ \text{keseluruhan} &= \frac{\text{volume sampel}}{0,231 \text{ gram/L} \times 5 \text{ m}} \end{aligned}$$

$$= 0,2 \text{ ml}$$

$$= 5,775 \text{ gram/L}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 4. Perhitungan massa gula reduksi hasil hidrolisis enzimatis

Diambil salah satu data dari variabel I

$$\text{Konsentrasi gula} = 5,775 \text{ gram/L}$$

$$\text{Volume larutan hasil} = 30 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa gula reduksi} &= \text{konsentrasi gula} \times \text{volume larutan} \\ &= 5,775 \text{ g/L} \times (30/1000) \\ &= 0,173 \text{ gram} \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

#### 5. Perhitungan massa gula reduksi total hasil hidrolisis

Diambil salah satu data dari variabel I

$$\begin{aligned} \text{Massa gula} &= 0,173 \text{ gram} \\ \text{Massa Padatan} &= 4,61 \text{ gram} \\ &\quad \text{Massa gula} \times \\ \text{Massa gula total} &= \text{massa padatan} \\ \text{Massa gula total} &= 0,173 \times 4,61 \\ \text{Massa gula total} &= 0,7975 \text{ gram} \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

#### 6. Perhitungan massa gula hasil pretreatment + hidrolisis enzimatis

Diambil salah satu data dari variabel I

$$\begin{aligned} \text{Massa gula subkritis} &= 0,015 \text{ gram} \\ \text{Massa gula hidrolisis} &= 0,7975 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa gula keseluruhan} &= \text{Massa gula subkritis + massa gula hidrolisis enzimatik} \\
 \text{Massa gula keseluruhan} &= 0,015 + 0,798 \\
 &= 0,813 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

#### 7. Perhitungan Yield gula total

Diambil salah satu data dari hasil perhitungan variabel I

$$\begin{aligned}
 \text{Yield I} &= \frac{\text{Massa gula keseluruhan}}{\text{Massa total Sabut kelapa}} \\
 \text{Yield I} &= \frac{0,813}{6} \\
 \text{Yield I} &= 0,1381 \\
 \text{Yield II} &= \frac{\text{Massa gula keseluruhan}}{\text{Massa (Hemiselulosa + Selulosa)}} \\
 \text{Yield II} &= \frac{0,813}{2,43} \\
 \text{Yield II} &= 0,3404
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

10%

0%

10%

ml

1

ml

nit  
enzim

1

ml









variabel I





k

## RIWAYAT HIDUP PENULIS



Bergas Kristiadi dilahirkan di Madiun, Jawa Timur pada tanggal 8 Februari 1993. Penulis merupakan putra pertama dari tiga bersaudara dari pasangan dr. Herry Purwadi S, SpPK dan Ir. Retno Mudjilah Indraswari. Penulis mulai menempuh pendidikan formal di SDN Menanggal 601 Surabaya, sempat pindah ke SDK Santa Maria Kediri, lalu SMPN 1 Kediri, dilanjutkan ke SMAN 1 Kediri. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang perguruan tinggi di Program Studi S1 Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember di Surabaya. Penulis melakukan risetnya di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng, hingga kemudian melakukan penelitian yang berjudul:

**“PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS MENGGUNAKAN GAS PENEKAN N<sub>2</sub>”**

Untuk keterangan lebih lanjut mengenai penulis, dapat dilakukan melalui email [bergas.k08@gmail.com](mailto:bergas.k08@gmail.com) atau melalui telepon 0857-3586-9345.



## RIWAYAT HIDUP PENULIS



Yorgy Eka Pradipta dilahirkan di Salatiga, Jawa Tengah pada tanggal 25 Juni 1993. Penulis merupakan putra pertama dari dua bersaudara dari pasangan Witono Salim dan Masa Wigati. Penulis mulai menempuh pendidikan formal di SD Kristen 03 Salatiga, lalu SMP Kristen 2 Salatiga, dilanjutkan ke SMAN 1 Salatiga. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang perguruan tinggi di Program

Studi S1 Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember di Surabaya. Penulis melakukan risetnya di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng, hingga kemudian melakukan penelitian yang berjudul:

**“PEMBUATAN GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN METODE *PRETREATMENT* AIR SUBKRITIS MENGGUNAKAN GAS PENEKAN N<sub>2</sub>”**

Untuk keterangan lebih lanjut mengenai penulis, dapat dilakukan melalui email [yorgy.ldp6@gmail.com](mailto:yorgy.ldp6@gmail.com) atau melalui telepon 0857-9983-3772.